

---

# **Untersuchungen zu TNF in Monozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und gesunden Spendern**

---

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Christoph Mathar

Geburtsdatum / Geburtsort:

19.10.1982 / Wittlich

angefertigt an:

Universität Leipzig, Department für Innere Medizin, Sektion Rheumatologie, AG  
Experimentelle Rheumatologie.

Betreuer:

Prof. Dr. med. Ulf Wagner und Dr. rer. nat. Manuela Rossol

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.10.2017

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Die Rheumatoide Arthritis.....	1
1.1.1. Epidemiologie und Klinik .....	1
1.1.2. Ätiologie und Pathogenese.....	1
1.2 Der Tumornekrosefaktor.....	3
1.2.1 Struktur und Signaltransduktion von TNF .....	4
1.2.2 Regulationsmechanismen der TNF Expression in Monozyten .....	5
1.3 Fragestellung und Ziele .....	9
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Rekrutierung von Patienten und gesunden Probanden .....	11
2.2 Materialien .....	12
2.3 Methoden .....	15
2.3.1 Separation von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	15
2.3.2 Separation von Monozyten mit negativer Magnetseparation .....	15
2.3.3 Bestimmung der monozytären Expression von TACE mittels Durchflusszytometrie .....	16
2.3.4 Bestimmung der intrazellulären Expression von TNF, TIMP-3 und PR-3 in Monozyten.....	17
2.3.5 Messung der TNF und TNF Rezeptor 2 Sekretion von Monozyten mit Hilfe eines ELISA .....	17
2.3.6 Bestimmung der RNA Expression von TNF, TIMP-3,TACE und PR-3 in Monozyten mittels Real Time PCR .....	19
2.4 Statistische Auswertung .....	20
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
3.1 Deskriptive Statistik der Kohorten.....	21
3.2 Expression der mRNA von TNF, TACE, TIMP-3 und PR-3 in Monozyten.....	22
3.3 Expression von TACE auf Monozyten .....	23
3.4 Expression von intrazellulärem TNF, TIMP-3 und PR-3 in Monozyten.....	24
3.5 Sekretion von TNF und TNFR2 von Monozyten .....	28
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>32</b>
4.1 Expression von TNF sowie regulatorischer Moleküle auf mRNA Ebene .....	32
4.2 Expression von tmTNF und TACE auf der Oberfläche von Monozyten.....	35

4.3	Intrazelluläres Vorkommen von TNF sowie regulatorischer Moleküle in Monozyten.....	36
4.4	Sekretion von TNF und TNFR2 durch Monozyten .....	39
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung .....</b>	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>63</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>65</b>

## **Bibliographische Beschreibung**

Mathar, Christoph

### **Untersuchungen zu TNF in Monozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und gesunden Spendern**

Universität Leipzig, Dissertation

65 S., 142 Lit., 13 Abb., 1 Tab.

#### **Referat:**

Die Rheumatoide Arthritis ist die häufigste inflammatorische Arthritis mit einer Prävalenz von 0,5-1%. Im Rahmen eines Autoimmungeschehens noch unvollständig aufgeklärter Genese kommt es zu einer Inflammation der Synovialis vor allem der kleinen peripheren Gelenke. Pathophysiologisch spielen Fehlsteuerungen sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunabwehr eine bedeutende Rolle. Im Fokus stehen dabei die Interaktion von Monozyten und Makrophagen mit T-Lymphozyten, sowie eine konsekutiv überschießende Produktion proinflammatorischer Zytokine, insbesondere TNF. Der Tumornekrosefaktor wird in besonderem Maße von Monozyten sezerniert. Es ist beschrieben, dass Monozyten von RA Patienten eine veränderte Kinetik in der Sekretion von sTNF aufweisen. Die Ursache hierfür bleibt bisher unaufgeklärt. Dabei ist die Regulation der TNF Expression komplex und manifestiert sich vor allem posttranslational. Eine besondere Rolle spielt dabei das proteolytische Shedding durch TACE/ADAM-17, die durch TIMP-3 reguliert wird. Mögliche intrinsische Fehlsteuerungen der monozytären TNF Produktion betreffen demnach die mRNA Expression, die posttranslationale Prozessierung, insbesondere das Shedding durch TACE.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung dieser potentiellen intrinsischen Dysregulationen der TNF Expression in humanen Monozyten von RA Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern. Auf Ebene der mRNA Expression zeigten unstimulierte Monozyten von RA Patienten keine veränderten Transkriptionslevel von TNF, ADAM-17, TIMP-3 oder PR-3. Im Gegensatz hierzu war die Expression von intrazellulärem TNF in RA Monozyten signifikant gesteigert. Der Anteil TIMP-3 exprimierender, CD14 positiver Zellen war jedoch tendenziell bei RA Patienten vermindert. Nach Stimulation mit LPS sezernierten RA Monozyten tendenziell mehr TNFR2 als Monozyten in der Vergleichsgruppe. Ein vermehrtes Shedding von TNF wurde bei RA Monozyten nicht beobachtet.

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
Ak	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
CCP	cyclic citrullinated peptide
CD	cluster of differentiation
DMARD	disease modifying anti-rheumatic drugs
DNA	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescent activated cell sorter
Fc	Fragment crystalline
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HLA	human leucocyte molecule
Ig	Immunglobulin
JAK	Janus Kinase
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetic cell separation
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase

MHK	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MTX	Methotrexat
n	Anzahl
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
Ng	Nanogramm
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PR-3	Proteinase - 3
RA	Rheumatoide Arthritis
ROI	reactive oxygen intermediates
RPMI	Resowell Park Memorial Institute
RT-PCR	Real Time PCR
sTNF	lösliches TNF
sTNFR	löslicher TNF Rezeptor
TACE	TNF alpha converting enzyme
Taq	Thermus aquaticus
TIMP-3	tissue inhibitor of metalloproteinases - 3
tmTNF	transmembranes TNF
TNF	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
wt	Wildtyp

## **1. Einleitung**

### **1.1. Die Rheumatoide Arthritis**

#### **1.1.1. Epidemiologie und Klinik**

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch progressive Erkrankung. Sie hat eine Prävalenz von 0,5 – 1 % und tritt mit einem Verhältnis von 2,5:1 häufiger bei Frauen als bei Männern auf (1). Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen 40 und 70 Jahren. Im Rahmen eines autoimmunologischen Prozesses unklarer Genese kommt es zu einer Inflammation der Synovialis meist der peripheren Gelenke vor allem der Hände und Füße mit einem symmetrischen Befallmuster im Sinne einer Polyarthritis (2). Insbesondere die PIP, MCP bzw. MTP sowie Hand- und Sprunggelenke sind betroffen. Die Gelenkdestruktion schreitet dabei chronisch progressiv voran. Bei 70 % der Patienten finden sich innerhalb von 2 Jahren nach Ausbruch der Erkrankung radiologische Zeichen einer irreversiblen Destruktion der betroffenen Gelenke (3). Neben einer chronischen Polyarthritis kommt es bei bis zu 47 % der Patienten auch zu extraartikulären Manifestationen. Mit bis zu 27 % ist dabei das kardiovaskuläre System betroffen (4). Dies führt zu einer gesteigerten Mortalität unter Patienten mit rheumatoider Arthritis (5). Weiterhin kann es zu Beteiligung anderer Organsysteme kommen. Beschrieben sind unter anderem Episkleritiden, ein Sjögren Syndrom, Anämien und pulmonale Manifestationen, Vaskulitiden sowie Hautbeteiligungen (6).

Klinisch treten zu Beginn der Erkrankung meist Schmerzen und Schwellungen der kleinen peripheren Gelenke auf. Eine Morgensteifigkeit ist dabei charakteristisch. Weiterhin wird von den Patienten eine B-Symptomatik mit Fieber und Gewichtsverlust beschrieben. Allgemeine Schwäche, Müdigkeit sowie Abgeschlagenheit und Appetitverlust werden ebenfalls beklagt (3).

#### **1.1.2. Ätiologie und Pathogenese**

Die Rheumatoide Arthritis ist eine autoimmunologische Erkrankung noch ungeklärter Genese. Wahrscheinlich spielen sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle bei der Entstehung. Zwillingsstudien haben gezeigt, dass monozygote Zwillinge eine Konkordanzrate von 15-30 % aufweisen, während es bei dizygoten nur 5 % sind (7) . Die stärkste bisher nachgewiesene Assoziation besteht dabei mit bestimmten Allelen des Humanen Leukozyten Antigens (HLA). Diese gehören zum Major Histocompatibility Complex II auf Chromosom 6. Strukturell ähnliche Allele im Bereich der HLA-DRB1-Region treten bei Patienten mit seropositiver RA besonders häufig auf. Sie werden als shared epitope bezeichnet. Patienten mit dieser Prädisposition weisen eine besondere Suszeptibilität für die Entstehung einer RA auf (8). Eine mögliche

Erklärung ist, dass Alterationen in der T-Zell vermittelten Antigenpräsentation und Antigenerkennung zur Genese beitragen. Außerdem könnte das Phänomen der Molekularen Mimikry, also die strukturelle Ähnlichkeit mikrobieller Proteine mit dem shared epitope, ätiologisch bedeutsam sein. (9). Des Weiteren konnten Begovich et. al zeigen, dass ein Missense Polymorphismus im PTPN22 Gen ebenfalls mit der RA assoziiert ist (10). Dieses kodiert für eine Tyrosin Phosphatase, die eine Rolle bei der Aktivierung von T Lymphozyten spielt.

Neben der T-Zell Aktivierung scheinen auch single nucleotide polymorphisms von Genen zur Genese beizutragen, die den NF- $\kappa$ B Pathway betreffen. So sind bestimmte Allele des Gens, das für die Peptidylarginin deiminase (PADI4) kodiert, ebenfalls mit der Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis assoziiert. Die PADI4 ist dabei für die posttranslationale Konversion von Arginin in Citrullin von Proteinen der Mukosa verantwortlich. Polymorphismen in diesem Gen könnten demnach bei der Entstehung von Antikörpern gegen solche veränderten Proteine ursächlich sein und damit zum Zusammenbruch der immunologischen Toleranz beitragen (11). Dabei werden Autoantikörper, die definierend für eine seropositive RA sind, bei der serologischen Diagnostik genutzt. Anti-CCP Antikörper (ACPA) weisen eine hohe Spezifität von bis zu 96 % auf und lassen sich bei etwa 48 – 53 % der RA Patienten nachweisen. Bei den bereits 1940 entdeckten Rheumafaktoren handelt es sich meist IgM Antikörper, die gegen das Fc Fragment des Immunglobulin G gerichtet sind. Sie finden sich bei 50 – 80 % der Patienten mit RA, weisen mit 91 % jedoch einer geringere Spezifität auf. (12). Das Auftreten von Autoantikörpern im Rahmen der RA korreliert mit einem schwereren Verlauf der Erkrankung und einer gesteigerten Mortalität. Rheumafaktoren sind mit einem erhöhten Risiko für einen Tod auf Grund einer neoplastischen oder respiratorischen Erkrankung verbunden. ACPA sind mit einer erhöhten kardiovaskulären Todesursache assoziiert (13). Während genetische Dispositionen zu etwa 60 % zur Genese der RA beitragen, sind auch Umweltfaktoren wie Rauchen oder andere bronchiale Stressoren mit einer erhöhten Suszeptibilität verbunden (14). Weiterhin spielen auch Infektionen wie beispielsweise mit *Porphyromonas gingivalis* assoziierte Periodontitiden eine Rolle. Dabei verfügt *P. gingivalis* über eine Peptidyldeiminase und kann somit zur Citrullinierung von Peptiden und damit zur Entstehung von ACPA beitragen (15).

Pathophysiologisch stehen bei der rheumatoiden Arthritis eine Inflammation mit einhergehender Hyperplasie der Synovialis der betroffenen Gelenke, sowie eine Infiltration von Zellen der angeborenen als auch adaptiven Immunantwort im Fokus.



Als Ursache wird die Aktivierung von T Lymphozyten durch Präsentation eines noch unaufgeklärten arthrotropischen Antigens durch Makrophagen der Synovialis diskutiert. Konsekutiv kommt es zur Expansion antigenspezifischer T Zellen. Diese aktivieren B-Lymphozyten, Monozyten und Fibroblasten (16). Über proinflammatorische Zytokine wird der Efflux von Leukozyten aufrechterhalten sowie eine Aktivierung von Fibroblasten und Osteoklasten vorangetrieben. Dabei spielen vor allem TNF und Interleukine (IL-1, IL-6, IL-17), ROIs, Prostanoiden sowie Matrix Metalloproteinasen eine bedeutende Rolle (17).

Während bei der Initiierung der RA CD4+ T Zellen im Mittelpunkt stehen, scheinen bei der Aufrechterhaltung und Progression Monozyten und Makrophagen die Hauptakteure zu sein. Sie sezernieren sowohl TNF als auch Interleukin 1 und stimulieren dadurch synoviale Fibroblasten, Osteoklasten und Chondrozyten zur Produktion von Metalloproteinasen. Zusätzlich inhibiert TNF die Produktion von Metalloproteinasen hemmenden Enzymen (tissue inhibitors of metalloproteinases) wirkt (18). Hauptverantwortlich für die Destruktion des gelenknahen Knorpel- und Knochengewebes sind Metalloproteinasen (19). Die pathophysiologisch zentrale Rolle des Zytokins TNF spiegelt sich auch durch den erfolgreichen Einzug von monoklonalen Antikörpern gegen TNF in die Therapie der RA wider. So konnten beispielsweise Lipsky et. al zeigen, dass bei bis zu 67 % der Patienten ein deutlicher Rückgang der Klinik durch Gabe von Infliximab in Kombination mit Methotrexat erreicht wurde (20).

## **1.2 Der Tumornekrosefaktor**

TNF wird vor allem von Monozyten und Makrophagen im Rahmen akuter inflammatorischer Prozesse sezerniert und spielt u.a. eine zentrale Rolle bei durch gramnegativen Erregern induzierten septischen Geschehen (21,22). Erstmals 1893 beschrieb der amerikanische Chirurg William B. Coley einen Rückgang von malignen Weichteiltumoren bei Mäusen nach Transfektion mit streptokokkeninfizierten Hautgeweben aus Erysipelen (23). Erst 1968 gelang es ein von Lymphozyten sezerniertes, zytotoxisches Protein zu isolieren (24). Dieses Protein wurde 1975 in Serum von Mäusen entdeckt, die zuvor mit dem Bacillus Calmette-Guérin infiziert wurden und erhielt zunächst den Namen Lymphotoxin (25). Eine Injektion dieses Proteins in maligne Tumoren führte zur Nekrose der neoplastischen Gewebe und damit schließlich zur Namensgebung Tumor Nekrose Faktor. (26) Später zeigte sich, dass strukturelle Abweichungen zwischen zwei Nekrose auslösenden Faktoren bestehen. So weisen die von Lymphozyten sezernierten Proteine zwar Sequenzhomologien zu

den von durch Makrophagen und Monozyten produzierten Faktoren auf, unterscheiden sich jedoch in ihren Aminosäurestrukturen. Zur Unterscheidung wurden die Begriffe TNF  $\beta$  für das Lymphotoxin und TNF  $\alpha$  für das durch Makrophagen und Monozyten sezernierte Protein eingeführt (27) (28). Die zentrale Rolle bei der RA spielt dabei das TNF $\alpha$ . So konnten Saxne et. al TNF $\alpha$  in Seren und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis finden, jedoch kein TNF $\beta$  detektieren (29). 1991 entwickelten Keffer et. al eine transgene Mauslinie, die ein modifiziertes humanes TNF exprimiert. Die transgenen Mäuse entwickelten eine chronische Polyarthrit, die durch Behandlung mit monoklonalen TNF Antikörpern reversibel war. Hiermit zeigte sich ein weiterer deutlicher Hinweis für die Bedeutung des TNF in der Pathogenese der RA (30).

### 1.2.1 Struktur und Signaltransduktion von TNF

TNF wird in erster Linie von aktivierten Monozyten und Makrophagen, jedoch auch von T-Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten produziert (28). Es existiert eine membrangebundene Form (tmTNF) und eine lösliche Form (sTNF) (31). Zunächst wird das sogenannte Pro-TNF als Vorläufermolekül mit einem Molekulargewicht von 26 kDa translatiert (32). Nach Verlassen des endoplasmatischen Retikulums über den Golgi-Apparat wird das Pro-TNF in tubulären Vesikeln und nach Fusion mit einem Endosom zur Membran der Zelle transportiert. Hier wird es als Typ II Membranprotein integriert. (33,34). Der N-Terminus liegt dabei im Zytoplasma, während der C-Terminus nach extrazellulär orientiert ist. Die transmembrane Form des TNF setzt sich aus drei der 26 kDa messenden Monomeren, die jeweils aus 233 Aminosäuren aufgebaut sind, zusammen (35). Es konnten verschieden posttranslationale Modifizierungen des tmTNF beschrieben werden. So entdeckten Utsumi et. al eine Palmitoilierung am Übergang der transmembranären zur zytoplasmatischen Domäne und Poscik et. al eine Phosphorylierung eines Serinrestes der intrazellulären Domäne (36,37). Diese posttranslationalen Veränderungen könnten eine Bedeutung für die Funktion des tmTNF haben, das sowohl als Ligand in der Zell-Zell-Interaktion als auch als Rezeptor fungieren kann (38–40). Das tmTNF wird durch die Matrix-Metalloproteinase TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) durch proteolytische Spaltung zwischen den Residuen Alanin<sup>76</sup> und Valin<sup>77</sup> in die membrangebundene Form, das lösliche TNF überführt (41). Diese besteht aus 157 Aminosäuren und setzt sich ebenfalls aus drei Monomeren zu je 17 kDa zusammen. Die zurückbleibende zytoplasmatische Domäne wird nach der Spaltung in den Nukleus redigiert (42). TNF wir zu einer übergeordneten Gruppe, der TNF-Liganden-Superfamilie, zugeordnet. Die 19 Mitglieder dieser Familie, u.a. TNF $\beta$ , CD40-Ligand, Fas-Ligand, TRAIL weisen Sequenzhomologien auf und spielen eine

Rolle bei inflammatorischen Prozessen, Proliferation, Angiogenese, Apoptose und vielen anderen (43,44). Sowohl lösliches TNF als auch die membrangebundene Form können durch Bindung an spezifische Rezeptoren eine Vielfalt an Effekten auslösen. Dabei wurden bisher zwei spezifische Rezeptoren identifiziert: TNFR1/p55 und TNFR2/p75 (45). Während TNFR1 von allen Körperzellen exprimiert wird, ist die Expression von TNFR2 auf Zellen des Immunsystems, des Nervensystems, endothelialen und kardialen Zellen beschränkt. Lösliches TNF bindet vermutlich vor allem an den 55-60 kDa messenden TNFR1. Dabei werden pleiotrope Effekte ausgelöst, indem verschiedene proinflammatorische Signalkaskaden aktiviert werden, insbesondere über den p38-MAPK, JNK und den NF $\kappa$ B Weg aktiviert werden. Bindet TNF an TNFR1 führt dies zur Internalisierung des Rezeptorkomplexes (46). Über eine intrazellulär gelegene sogenannte Todes Domäne kann dadurch Apoptose ausgelöst werden (47). Dabei wird zunächst TRADD zur Todesdomäne rekrutiert. Weitere Moleküle wie FADD folgen und führen über Caspase Aktivierungen zu DNA Degradierung und damit zum programmierten Zelltod (48,49). Ein weiterer Signalweg besteht über die Rekrutierung von TRADD und cIAP (50) und RIP (51), die über Bindung von TRAF2 zur Aktivierung verschiedener Kinasen wie MAP Kinase, JNK Kinase und p38 Kinase führen (51,52). Interessanterweise vermag TNF $\alpha$  über Aktivierung des NF $\kappa$ B Wegs, Zellüberleben und Proliferation auszulösen (53).

Der TNF Rezeptor 2 hingegen hat ein Molekulargewicht von 75-80 kDa. Bisher konnte u.a. gezeigt werden, dass vor allem tmTNF über direkten Zell-Zell-Kontakt an den selteneren Rezeptor bindet (54). Obwohl eine Überlappung mit dem downstream signalling von TNFR1 besteht, führt die Aktivierung von TNFR2 vor allem zu Proliferation und Überleben der betreffenden Zelle via des NF- $\kappa$ B Pathways (55). Stimulation durch LPS verursacht ein shedding des TNFR2 von Monozyten, sowie eine Herunterregulierung der Expression auf der Oberfläche (56). Peschon et. al konnten zeigen, dass TACE für die Überführung von membranständigem TNFR2 in die lösliche Form auf Monozyten verantwortlich ist. Neben dem shedding von TNF spaltet TACE demnach auch TNFR2 von der Oberfläche stimulierter Monozyten ab (57).

### **1.2.2 Regulationsmechanismen der TNF Expression in Monozyten**

Monozyten spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Dabei unterscheiden sich Monozyten von RA Patienten hinsichtlich der Häufigkeit ihrer Subpopulationen (58). Außerdem exprimieren Monozyten von RA Patienten vermehrt Aktivierungsmarker, die der Zelladhäsion und -migration dienen (59). Zur weiteren Aufklärung der Rolle von Monozyten in der Pathophysiologie der RA

wurden Monozyten im Hinblick auf die Expression proinflammatorischer Zytokine untersucht. Dabei konnte u.a. eine gesteigerte Expression von TNF beschrieben werden. So sezernieren aktivierte Monozyten von Patienten mit RA nach Stimulation mit LPS signifikant gesteigerte Mengen an sTNF im Vergleich zu gesunden Probanden (60,61). Die basale TNF Produktion scheint ebenfalls gesteigert zu sein, variiert jedoch deutlicher zwischen Monozyten einzelner RA Patienten (59). Die hierfür zugrundeliegenden Regulationsmechanismen sind noch weitgehend unaufgeklärt. Eine posttranslationale Dysregulation ist wahrscheinlich, da eine gesteigerte mRNA Expression in Monozyten von RA Patienten bisher nicht sicher beschrieben werden konnte (62,63).

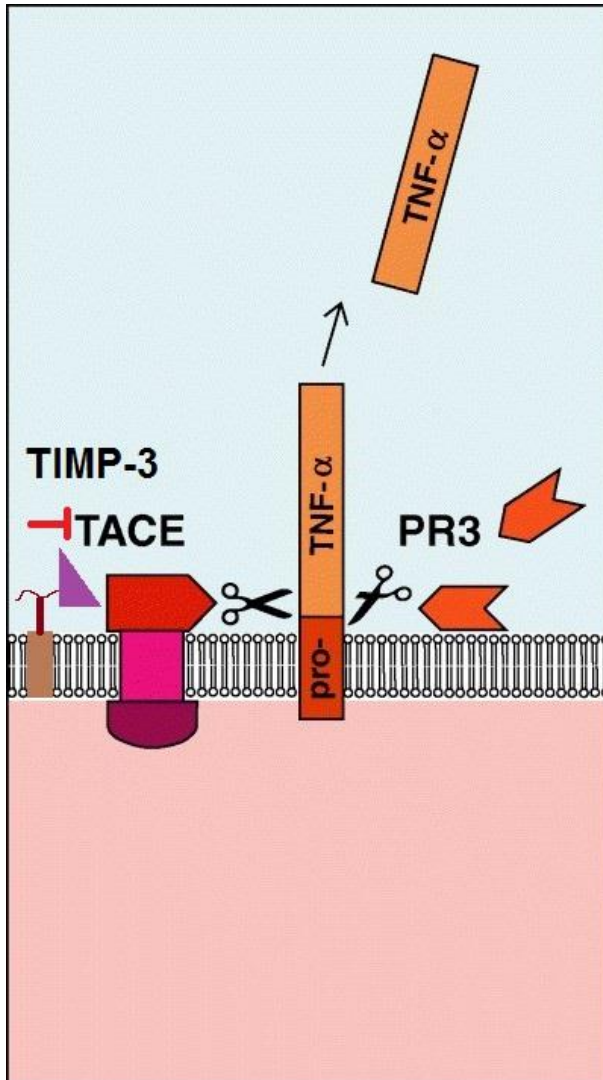
Als wichtigstes Enzym in der Prozessierung des TNF spielt die Matrix Metalloproteinase TACE (ADAM-17), ein Mitglied der a disintegrin and metalloproteinase Familie, eine bedeutende Rolle. Die ADAMs sind Typ-I-Transmembran Multi Domain Metalloproteasen. ADAM-17 wird ubiquitär exprimiert. In Knorpelgeweben betroffener Gelenke von RA Patienten wurde eine gesteigerte Expression von TACE beschrieben (64). Außerdem trägt es zur überschießenden Produktion von TNF $\alpha$  in Synovialgewebe von RA Patienten bei (65). Neben tmTNF spaltet ADAM-17/TACE auch TNFR1 und TNFR2, IL-6R sowie Liganden und Adhäsionsmoleküle (41,66). Verschiedene Arbeitsgruppen gelang die Inhibierung der Matrix Metalloproteinase. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch Blockade von TACE, eine überschießende Sekretion von TNF $\alpha$  durch mononukleäre Zellen nach Stimulierung mit LPS komplett verhindert werden konnte. Weiterhin konnte zumindest teilweise eine konsekutive Akkumulation von membranständigem TNF $\alpha$  beschrieben werden (67–70). Präklinische Studien mit synthetischen Inhibitoren des TACE konnten eine Reduktion arthritischer Symptome im Mausmodell zeigen. Klinische Studien blieben jedoch entweder auf Grund von hepatotoxischen Wirkungen oder fehlender Wirksamkeit ohne Erfolg (71). Bohgaki et. al konnten eine vermehrte Expression von TACE auf peripheren Monozyten von Patienten mit früher Systemischer Sklerose zeigen. Monozyten von Patienten mit RA wiesen jedoch keine gesteigerte TACE Expression auf (72).

Da Matrixmetalloproteinasen physiologisch durch sogenannte tissue inhibitor of Metalloproteinasen reguliert werden, untersuchten Amour und Kollegen 1998 drei der mittlerweile vier bekannten Subtypen (73). Sie entdeckten, dass nur TIMP-3 und nicht TIMP-1 oder -2 TACE inhibiert (74). TIMP-3 grenzt sich noch durch weitere Besonderheiten ab. Während TIMP-1, 2 sowie 4 lösliche Faktoren sind, ist TIMP-3 an

die Extrazellulärmatrix gebunden (75). Weiterhin kann TIMP-3 in verschiedenen Zelltypen Apoptose auslösen (76–78). Außerdem konnten Smith und Kollegen 1999 zeigen, dass TIMP-3 den programmierten Zelltod in humanen Colon Ca Zellen über die Stabilisierung von TNF Rezeptoren auf deren Oberfläche auslöst (79). Die Bedeutung von TIMP-3 in der TNF Prozessierung zeigten Mohammed et. al mit der Entwicklung transgener, TIMP-3 defizienter Mäuse, die auf Grund einer konsekutiven TNF Überaktivität chronische Hepatitiden entwickelten (80). Van der Laan et. al konnten mittels Überexpression von TIMP-3 in synovialen Fibroblasten von RA Patienten deren Proliferation und Invasion in einem invitro Modell signifikant reduzieren (81). In Monozyten konnte bisher eine reduzierte Expression von TIMP-3 in Verwandten 1. Grades von Patienten mit Diabetes mellitus Typ II beschrieben werden. Die verminderte Expression korrelierte mit einer gesteigerten Aktivität der TACE/ADAM-17 (82). Daten zur TIMP-3 Expression in Monozyten von RA Patienten sind in der Literatur aktuell nicht beschrieben.

Ein weiterer möglicher Regulationsmechanismus der TNF Sekretion ist die Inhibition durch die Proteinase-3. Entdeckt wurde die PR-3 von Baggiolini und Kollegen 1978 als in azurophilen Granula von Polymorphonukleären Leukozyten (PMNL) vorkommende Esterase (83). Rao et. al isolierten und analysierten PR-3 und zeigten ihr Eigenschaft als Serinprotease auf (84). Ihre Bedeutung in autoimmunologischen Erkrankungen erhielt sie durch die Entdeckung, dass Patienten mit Wegener Granulomatose mit einer Prävalenz von 80-90 % antineutrophile zytoplasmatische Antikörper gegen PR-3 (c-ANCA) entwickeln (85). In humanen Monozyten lässt sich PR-3 sowohl in lysosomalen Vakuolen als auch als membranständiges Molekül detektieren. Außerdem finden sich hohe Serumspiegel in Gesunden und signifikant erhöhte Konzentrationen in Seren von Patienten mit connective tissue diseases (86). PR-3 scheint dabei eine Rolle in der Regulation von proinflammatorischen Signalkaskaden zu haben. So konnten Yard et. al durch Inkubation von Monozyten mit PR-3 in vitro als auch im Vollblut eine Reduktion der CD14 (= Rezeptor für LPS (87)) Expression erzielen. Weiterhin beschrieben sie eine konsekutive Inhibierung der monozytären TNF Produktion nach Stimulation mit LPS (88). Einen Hinweis auf eine direkte Beteiligung der PR-3 an der proteolytischen Spaltung von TNF fanden Robach-Gallea et. al mit Hilfe eines in vitro cleaving assays. Die Arbeitsgruppe belegte, dass PR-3 in der Lage ist, proTNF an Val77Arg78 zu spalten (89). Coeshott et. al konnten 1999 mit LPS stimulierte THP-1 Zellen, eine Monozytenzelllinie, durch Inkubation mit PR-3 zu einer deutlich gesteigerten TNF Sekretion anregen (90). Darüber hinaus konnten Tarzi et. al 2015 membranständige PR-3 auf Monozyten sowohl von Gesunden als auch von Patienten mit ANCA

assoziierter Vaskulitis nachweisen. Dabei exprimierten vor allem die sogenannten klassischen Monozyten (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) als auch die intermediären CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, die in der RA expandiert sind (91), membranständige PR-3. (92). Die Bedeutung von PR-3 für die monozytäre Sekretion von TNF $\alpha$  im Rahmen der Pathophysiologie der RA bleibt allerdings bisher unaufgeklärt.



**Abbildung 1: Prozessierung von tmTNF.** TNF wird zunächst als ein Typ II Membranprotein in die Zellmembran integriert. (33,34). Die transmembrane Form des TNF (pro-TNF) setzt sich aus drei der 26 kDa messenden Monomeren, die jeweils aus 233 Aminosäuren aufgebaut sind, zusammen (35). Das tmTNF wird durch die Matrix-Metalloproteinase TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE) durch proteolytische Spaltung zwischen den Residuen Alanin<sup>76</sup> und Valin<sup>77</sup> in die membrangebundene Form, das lösliche TNF überführt (41). Diese besteht aus 157 Aminosäuren und setzt sich ebenfalls aus drei Monomeren zu je 17 kDa zusammen (42). Neben der TACE kann auch die Serinprotease Proteinase 3 (PR-3) membranständiges TNF von der Zelloberfläche abspalten. PR-3 kommt sowohl in lysosomalen Vakuolen als auch auf der Zelloberfläche von Monozyten vor (92). Ein bedeutender Regulationsmechanismus ist die Inhibition der TACE durch die Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP-3) (74). TIMP-3 ist an die Extrazellulär Matrix gebunden und kann auch, wie hier abgebildet, über Heparansulfatproteoglykane an die Zelloberfläche binden (93).

### 1.3 Fragestellung und Ziele

Monozyten von RA Patienten unterscheiden sich in ihrer TNF Expression von Monozyten gesunder Spender. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass RA Monozyten signifikant mehr membranständiges TNF exprimieren als Monozyten gesunder Spender (94).

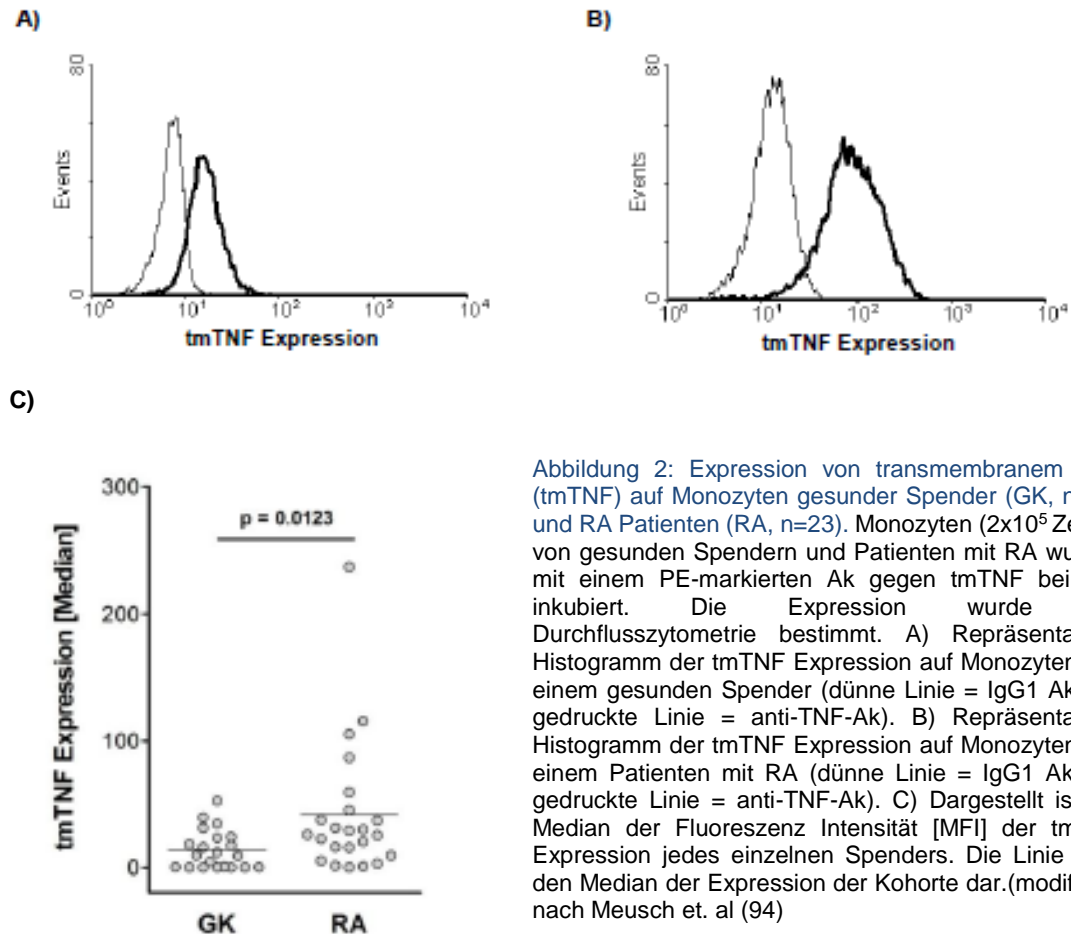


Abbildung 2: Expression von transmembranem TNF (tmTNF) auf Monozyten gesunder Spender (GK, n=21) und RA Patienten (RA, n=23). Monozyten ( $2 \times 10^5$  Zellen) von gesunden Spendern und Patienten mit RA wurden mit einem PE-markierten Ak gegen tmTNF bei 4°C inkubiert. Die Expression wurde mit Durchflusszytometrie bestimmt. A) Repräsentatives Histogramm der tmTNF Expression auf Monozyten von einem gesunden Spender (dünne Linie = IgG1 Ak, fett gedruckte Linie = anti-TNF-Ak). B) Repräsentatives Histogramm der tmTNF Expression auf Monozyten von einem Patienten mit RA (dünne Linie = IgG1 Ak, fett gedruckte Linie = anti-TNF-Ak). C) Dargestellt ist der Median der Fluoreszenz Intensität [MFI] der tmTNF Expression jedes einzelnen Spenders. Die Linie stellt den Median der Expression der Kohorte dar. (modifiziert nach Meusch et. al (94))

In wie fern ebenfalls die intrazelluläre TNF Expression in Monozyten von RA Patienten verändert ist, ist bisher nicht befriedigend beschrieben. Die der TNF Überexpression, respektive Sekretion, zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher unaufgeklärt. Ziel der Arbeit war die Untersuchung potentieller intrinsischer Dysregulationen auf den Ebenen der mRNA Expression sowie dem Shedding durch TACE/ADAM-17 im Hinblick auf die Expressierung und Sekretion von TNF in Monozyten von RA Patienten.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Unterscheiden sich Monozyten von RA Patienten von Monozyten gesunder Spender hinsichtlich der Expression von TNF sowie der an der TNF Prozessierung beteiligten Proteine TACE/ADAM-17, TIMP-3 und PR-3 auf Ebene der mRNA?
2. Gibt es Unterschiede zwischen der Expression von intrazellulärem TNF sowie den regulatorischen Proteinen TIMP-3 und PR-3 sowie membranständiger TACE in Monozyten von RA Patienten im Vergleich zu Monozyten gesunder Spender?
3. Differieren die basale Produktionsrate von sTNF sowie TNFR2 und deren Shedding nach Stimulation durch LPS zwischen Monozyten von RA Patienten und gesunden Kontrollen?



## **2. Material und Methoden**

Im Rahmen der Studie wurden 19 Patienten mit Rheumatoider Arthritis sowie 20 nach Alter und Geschlecht gematchte, gesunde Probanden eingeschlossen.

### **2.1 Rekrutierung von Patienten und gesunden Probanden**

Unter der Leitung von Prof. Dr. Ulf Wagner wurden von Januar 2012 bis November 2014 Patienten mit rheumatoider Arthritis aus dem Pool des Universitätsklinikums in die Studie eingeschlossen. Einschlusskriterien waren die Folgenden:

- Rheumatoide Arthritis gemäß den aktuellen ACR/EULAR Kriterien 2010
- Keine aktuelle Therapie mit anti-TNF-Ak
- Alter zwischen 18 und 75 Jahren
- Einwilligung nach Aufklärung über die Studie

Als Ausschlusskriterien wurden folgende vereinbart:

- Bestehende Anti-TNF-Therapie
- Akute entzündliche Erkrankungen
- Weitere chronisch entzündliche oder autoimmunologische Erkrankungen

Über den Blutspendedienst des Universitätsklinikums wurden gesunde Probanden rekrutiert. Folgende Einschlusskriterien mussten erfüllt sein:

- Alter zwischen 18 und 75 Jahren
- Einwilligung in die Studie

Die Ausschlusskriterien für die Teilnahme waren:

- Diagnostizierte Rheumatoide Arthritis oder sonstige Autoimmunerkrankungen des Probanden oder eines Verwandten 1. Grades
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Akute entzündliche Erkrankungen

Alle Probanden und Patienten wurden sowohl mündlich als auch schriftlich über die Studie aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis auf entsprechenden Formularen zur Teilnahme als auch zur anonymisierten Weiterverwendung der erhobenen Daten.

## 2.2 Materialien

### Laborgeräte

Durchflusszytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FACS Calibur	
ELISA-Reader Synergy <sup>TM</sup> HT	BioTek, Vermont, USA
Gefriertruhe – 20°C	Hettich, Tuttlingen, D
Gefriertruhe – 80°C	Hettich, Tuttlingen, D
Inkubator	Binder, Tuttlingen, D
Kühlschrank premium	Liebherr, Biberach an der Riss, D
MACS Zellseparation	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Mikroskop Axiostar	Carl Zeiss, Jena, D
Pipetten	Labsystems GmbH, Frankfurt a.M., D
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
NanoDrop 1000	
Sterilbank Herasafe KS	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg, D
Gradient	
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad Isotemp 215	Fisher Scientific, Schwerte, D
Zählkammer nach Neubauer	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen, D
Zentrifuge Eppendorf 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge Hettich Rotina 46 RS	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products, Langenselbold, D
7500 Real Time PCR Systems	Applied Biosystems, Branchburg, USA

### Verbrauchsmaterialien

Collection tube (2 ml)	Qiagen
EDTA Monovetten	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Eppendorfgefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
FACS Röhrchen	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
MACS-Zellseparationssäulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Pasteurpipetten	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Pipetten (10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A

Pipetten spitzen filter tip	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
QIAshredder™ 50	Qiagen, Hilden, D
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Dr. Ilona Schubert, Laborfachhandel, Leipzig, D
Zellkulturplatten (96 well)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A

### Chemikalien

Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Ethanol (99% unvergällt)	VWR International, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Formaldehydlösung (37 %)	Merck, Darmstadt, D
Fötale Kälberserum (FKS)	Life Technologies Gibco, Carlsbad, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Natriumazid (10 %)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Quantikine ELISA kit Human TNFRII	R&D Systems, Minneapolis, USA
Quantikine ELISA kit Human TNFα	R&D Systems, Minneapolis, USA
Reverse Transkriptase Kit RNase- und DNase frei)	Promega, Mannheim, D
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
Taq-DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Branchburg, USA
TaqMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Branchburg, USA
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Branchburg, USA
RNase free DNase Set	QIAGEN, Hilden, D
Türk's Reagen	Merck, Darmstadt, D

### Medien und Lösungen

Ethanol 70 %
--------------

Ethanol in Aqua dest.

FACS-Waschpuffer

PBS mit 2 % fetalem Kälberserum und 0,1 % Natriumazid

FACS-Fixierpuffer

PBS mit 3 % Formaldehydlösung

FACS-Blockpuffer

Facs-Waschpuffer mit 1mg/ml IgG

Lipopolysaccharid (LPS) Sigma Aldrich Taufkirchen, D

Stammlösung zu 1mg/ml LPS in Aqua dest.

PBS/EDTA

PBS mit 0,3 mM EDTA

Separationsmedium

PBS mit 10 % FKS und 2 mM EDTA

### **Antikörper**

IgG1 FITC R&D Systems, Minneapolis, USA

IgG1 PE R&D Systems, Minneapolis, USA

IgG2A PE R&D Systems, Minneapolis, USA

TACE PE R&D Systems, Minneapolis, USA

TIMP-3 FITC R&D Systems, Minneapolis, USA

TNF PE R&D Systems, Minneapolis, USA

### **Software**

CellQuest Becton Dickinson, Heidelberg, D

GraphPad Prism 5.02 Graph Pad Software Inc., USA

7500 System SDS Software Applied Biosystems, Branchburg, USA

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Separation von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Die Trennung der peripheren mononukleären Zellen vom Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden je Spender respektive Patient drei EDTA Monovetten zu je 9 ml abgenommen. Anschließend wurde das Plasma bei 430 g für 10 min zentrifugiert und abpipettiert. Die korpuskulären Bestandteile wurden im Verhältnis 1:10 in PBS/EDTA (0,3mM) verdünnt. Je 10 ml Ficoll Paque wurden mit 30 ml der Verdünnung überschichtet und für 25 min bei 700 g und 21°C zentrifugiert. Die sich in der Interphaseschicht befindlichen mononukleären Zellen wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und anschließend mit 4°C temperierter PBS/EDTA Lösung gewaschen. Hierauf erfolgten zwei Waschschrte mit PBS/EDTA Lösung unter Hinzugabe von 1mM FKS. Zur Entfernung von Erythrozyten wurde ein Zwischenschritt mit fünfminütiger Inkubation mit Erythrozytenlysepuffer unternommen. Die drei notwendigen Zentrifugationen im Rahmen der Waschschrte erfolgten jeweils bei 4° C für 10 min, einmal bei 500 g und zweimal bei 430 g. Die erhaltenen PBMCs wurden mit Türkscher Lösung gefärbt und in der Neubauerzählkammer quantifiziert.

### **2.3.2 Separation von Monozyten mit negativer Magnetseparation**

Die Separation von Monozyten von den restlichen PBMCs wurde mit negativer Magnetseparation erreicht. Dabei werden PBMCs in einem ersten Schritt mit biotinmarkierten Antikörpern inkubiert, die an diverse CD Oberflächenantigene außer CD 14 binden. In einem zweiten Schritt erfolgt eine Inkubation mit magnetisierten AK gegen Biotin. Hiernach sind lediglich die CD 14 positiven Zellen, also Monozyten, nicht mit AK beladen. Nach den Inkubationsschritten werden die Zellen auf eine magnetisierte Säule gegeben. Die mit AK konjugierten Zellen verbleiben in der Säule während die CD 14 positiven Zellen in einem Reaktionsgefäß gesammelt werden.

Die negative Magnetseparation erfolgte mit dem Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec). In einem ersten Schritt wurden je  $10 \times 10^5$  PBMCs, 30 µl Separationsmedium, 10 µl FcR Blocking Reagenz und 10 µl Biotin Antikörper Mix hinzugegeben und für 10 min bei 4° C abgedunkelt inkubiert. Hierauf wurden 30 µl Separationsmedium und 20 µl Antibiotin Microbeads hinzugegeben und für 20 min inkubiert. Die gewaschenen Monozyten wurden in 1 ml Separationsmedium resuspendiert und auf die Säule (MACS Zellseparation, Miltenyi Biotec) gegeben. Um adhärenente Monozyten aus der Säule zu spülen, wurden zuletzt 10 ml Separationsmedium nachgegeben. Die Quantifizierung

der gewonnenen Monozyten erfolgte optisch mit Hilfe eines Mikroskops nach Färbung mit Türkscher Lösung in der Neubauerzählkammer.

### **2.3.3 Bestimmung der monozytären Expression von TACE mittels**

#### **Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, sowohl membranständige als auch intrazelluläre Proteine in Zellen zu detektieren. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen an einem Laser vorbeigeführt und das von fluoreszierenden Antikörpern und von den Zellen gestreute Licht analysiert. Zunächst werden die Zellen mit Antikörpern inkubiert, die an die zu quantifizierenden Proteine binden. Die Antikörper sind mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert. Mit modernen FACS Geräten (Fluorescence Activated Cell Sorter) ist es möglich, mehr als 10000 Zellen pro Sekunde einzeln an mehreren Lasern vorbeizuführen und gleichzeitig bis zu 18 Proteine pro Zelle zu messen (95). Durch den Laser werden die mit Fluoreszenzfarbstoffe der an Oberflächenantigenen gebundenen Antikörper zur Emitierung von Licht spezifischer Wellenlänge angeregt. Neben der Quantifizierung von transmembranen oder intrazellulären Proteinen erlaubt die Analyse der Streuung des Laserlichtes durch die Zelle eine Aussage über deren Struktur. Dabei ist das Vorwärtstreulicht eine Funktion der Zellgröße und das Seitwärtstreulicht eine Funktion der Zellgranularität (96). PBMCs können mit einer FACS Analyse beispielsweise anhand ihrer CD Oberflächenantigene sowie ihrer Zellgröße und Komplexität in Subpopulationen unterteilt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen das TNF alpha converting enzyme Monozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und von gesunden Spendern untersucht. Hierzu wurden jeweils  $8 \times 10^5$  Monozyten abzentrifugiert (430 g, 4° C) und der Überstand vom Zellpellet vollständig entfernt. Die Monozyten wurden mit 200 µl FACS Blockpuffer resuspendiert und zu je 50 µl in FACS Röhrchen gegeben. Für 30 min wurden die Zellen mit Fitc und PE markierten Antikörpern gegen humanes TACE bei 4° C abgedunkelt inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 300 µl Fixierpuffer resuspendiert und bei 4° C bis zur FACS Analyse aufbewahrt. Die Zellen wurden innerhalb von 12 Stunden mit dem FACS Calibur (BD Biosciences) gemessen. Es wurden je zu bestimmenden Oberflächenantigen 10<sup>4</sup> Zellen analysiert und mit der Software Cell Quest (Becton Dickinson) ausgewertet.

### **2.3.4 Bestimmung der intrazellulären Expression von TNF, TIMP-3 und PR-3 in Monozyten**

Mit der Durchflusszytometrie ist es möglich auch intrazelluläre Proteine zu quantifizieren. Dazu werden die Zellen in einem ersten Schritt mit Hilfe eines formaldehydhaltigen Puffers fixiert. Anschließend werden die Zellmembranen durch Hinzugabe eines saponinhaltigen Puffers permeabilisiert. Dies erlaubt das Eindringen der Antikörper in das Zytoplasma und Binden an ihre spezifischen Antigene (97). Es wurden jeweils 106 CD 14 positive Zellen in 1 ml Separationsmedium suspendiert. Die Monozyten wurden für 30 min abgedunkelt auf Eis mit 1 µl Infliximab (10 µg/ml) inkubiert. Hierauf folgten drei Waschschrte mit 4°C kaltem PBS (430 g, 4° C, 8 min). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. Je 2 x 10<sup>5</sup> Monozyten wurden in ein FACS Röhrchen überführt und erneut gewaschen. Das Zellpellet wurde in 250 µl Fix/Perm Solution gelöst und für 20 min bei 4° C abgedunkelt inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrte mit 1 ml Perm/Wash Puffer wurden die Zellen für 30 min mit FITC und PE markierten Antikörpern gegen humanes TNF, PR-3 und TIMP-3 bei 4° C abgedunkelt inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Perm/Wash Puffer gewaschen und in 300 µl FACS Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte innerhalb von 12 Stunden am FACS Calibur (Becton Dickinson). Zur Auswertung wurde die Software Cell Quest verwendet.

### **2.3.5 Messung der TNF und TNF Rezeptor 2 Sekretion von Monozyten mit Hilfe eines ELISA**

Ein Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) nutzt das immunologische Prinzip der spezifischen Bindung eines Antikörpers an ein Antigen zur Detektion und Quantifizierung von spezifischen Antigenen wie beispielsweise Zytokinen. Es stehen verschiedene Typen des ELISA zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde ein Sandwich ELISA verwendet. Dabei werden die zu untersuchenden Proben in ein bereits mit Antikörpern beschichtetes Well gegeben. Diese richten sich gegen das zu analysierende Zielantigen. Nachdem mit Hilfe eines meist albuminhaltigen Puffer unspezifische Bindungen verhindert werden, wird die Probe mit dem enthaltenen Antigen in das Well gegeben. Die Antigene binden an die vorhandenen Antikörper und werden somit an das Well fixiert. In einem Zweiten Schritt werden spezifische Antikörper in einer Lösung hinzugegeben. Diese werden in einem weiteren Schritt mit enzymatischgekoppelten sekundären Antikörpern konjugiert. Hierzu wird ein Substrat gegeben. Durch die enzymatische Aktivität der gebundenen sekundären Antikörper

erfährt dieses einen Farbumschlag, der zur Quantifizierung der gebundenen Antigene genutzt wird (98).

Zunächst wurden je  $2 \times 10^5$  Monozyten mit 200  $\mu$ l 10% FKS haltigem und mit PS versetztem RPMI für 16 Stunden bei 37° C inkubiert. Insgesamt wurden  $8 \times 10^5$  Zellen je Proband respektive Patient kultiviert. Zur Hälfte blieben die Monozyten unstimuliert. Die andere Hälfte wurde während Inkubation mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Die Überstände wurden nach 16 Stunden abgenommen und bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration der Überstände wurde das Quantikine ELISA kit (R&D Systems) für humanen TNFR2 und für TNF nach Angaben des Herstellers verwendet. Zuerst wurden 50  $\mu$ l Assay Diluent je Well pipettiert, gefolgt von 200  $\mu$ l einer Verdünnungsreihe des Standards, respektive der Proben. Diese waren zuvor nach folgendem Schema mit RPMI Medium verdünnt worden:

TNF	Unstimuliert: 1:2	TNFR 2	unstimuliert: 1:5
	Stimuliert: 1:20		stimuliert 1:20

Durch die Verdünnung blieben die Zytokinkonzentrationen innerhalb des Messbereichs des ELISA. Nach Inkubation für 2 Stunden wurden die Wellplatten dreimal mit je 400  $\mu$ l/ Well Wash Buffer gewaschen. Zur Vollständigen Entfernung von verbliebenem Puffer wurden die Platten gegen Küchenpapier ausgeklopft. Hiernach wurden 200  $\mu$ l der jeweils spezifischen Antikörperlösung (gegen TNFR2 bzw. TNF) je Well hinzugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundene Antikörper restlos zu entfernen wurden anschließend drei weitere Waschschrte durchgeführt. Für die enzymatische Reaktion wurde 200  $\mu$ l Substratlösung je Well pipettiert und für 20 min abgedunkelt inkubiert. Die Reaktion wurde durch 50  $\mu$ l Stopplösung beendet und die Platte innerhalb von 30 min im ELISA Reader bei 450 nm ausgelesen. Die Auswertung erfolgte anhand des TNF Standards respektive des TNFR2 Standards mit der Software Excel mathematisch mit Hilfe einer 4 Parameter Logistic Curve Fit.



### 2.3.6 Bestimmung der RNA Expression von TNF, TIMP-3, TACE und PR-3 in Monozyten mittels Real Time PCR

Zur Ermittlung der RNA Expression wurden zunächst Monozyten aus Vollblut von Patienten mit Rheumatoider Arthritis und gesunden Spendern wie oben beschrieben separiert. Je Spender wurden zwischen  $15 \times 10^5$  und  $86 \times 10^5$  Monozyten mit mercaptoethanolhaltigem RLT Puffer lysiert und bei  $-80^\circ \text{C}$  gelagert. Die RNA wurde anschließend mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Kits aus dem Zelllysats nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Dabei wird durch Hinzugabe von Ethanol die RNA zunächst präzipitiert und anschließend auf eine Kieselgelsäule gegeben. Nach mehrmaligem Waschen und nach Deaktivierung möglicher DNasen mit Hilfe des DNase Sets (QIAGEN) wird die RNA in 50  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser eluiert.

Zur Amplifizierung und schließlich Quantifizierung spezifischer RNA Abschnitte muss diese in einem ersten Schritt in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde das Taqman Reverse Transkriptions Kit von Applied Biosystems verwendet. 12  $\mu\text{l}$  RNA wurden zu einem Reaktionsansatz (s.u.) von 17,95  $\mu\text{l}$  gegeben. Der Ansatz wurde in einem Thermocycler für 10 Minuten auf  $25^\circ \text{C}$ , 30 Minuten auf  $48^\circ \text{C}$  und 5 Minuten auf  $95^\circ \text{C}$  erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei  $-20^\circ \text{C}$  aufbewahrt.

Reaktionsansatz:	Taqman Puffer	3 $\mu\text{l}$
	25 mM $\text{MgCl}_2$	6,6 $\mu\text{l}$
	dNTP	6 $\mu\text{l}$
	Random Hexamers	1 $\mu\text{l}$
	RNase Inhibitor	0,6 $\mu\text{l}$
	Multisense Rtase	0,75 $\mu\text{l}$
	RNA	12 $\mu\text{l}$

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) erlaubt es, eine Aussage über die Expression von Templates zu treffen. Prinzipiell werden dabei in einem Thermocycler mit Hilfe von Primern spezifische Abschnitte der DNA exponentiell vervielfältigt. In drei Schritten wird die doppelsträngige DNA bei Temperaturen größer  $90^\circ \text{C}$  separiert. Bei  $50 - 75^\circ \text{C}$  binden komplementäre Oligonukleotide respektive Primer an den jeweiligen komplementären Einzelstrang. Zwei Primer markieren den Anfang und das Ende der zu amplifizierenden Region. Nach einer Temperaturerhöhung auf  $72 - 78^\circ \text{C}$  fungieren die Primer als Substrat für die DNA Polymerase, die einen komplementären Strang produziert. Werden diese Schritte wiederholt, steigt die Anzahl der kopierten Zielregion exponentiell, bis die Substrate aufgebraucht sind. Zur Quantifizierung der Templates werden fluoreszierende Moleküle ausgenutzt, die mit Hilfe der Exonuklease Aktivität

der Taq Polymerase aktiviert werden. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz auf Grund der wachsenden Anzahl an Templatekopien messbar wird, heißt threshold cycle ( $C_T$  Wert). Anhand des  $C_T$  Wertes kann die Templatekonzentration zu Beginn der Amplifikation berechnet werden. (99) Die Bestimmung der RNA Expression erfolgt mit dem TaqMan Gene Expression Master Mix (AB Applied Biosystems) sowie dem TaqMan Gene Expression Assay (AB Applied Biosystems). Zu jedem Reaktionsansatz wurden 2  $\mu$ l DNA einer Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l hinzugegeben. Als Kontrolle diente das Housekeeping Gen GAPDH.

Reaktionsansatz:	20 x TaqMan Gene Expression Assay	1 $\mu$ l
	20 x TaqMan Gene Expression Master Mix	10 $\mu$ l
	RNase-free water	7 $\mu$ l
	cDNA (100 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l

Als Gerät wurde das 7500 Real Time PCR Systems (AB Applied Biosystems) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der 7500 System SDS Software (AB Applied Biosystems).

## 2.4 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der erhobenen Daten wurde die Software GraphPad Prism 5.02 verwendet. Zunächst wurden die Daten auf ihre Normalverteilung mittel D'agoistini and Pearson omnibus normality test untersucht. Bei Erfüllung der Kriterien für eine Normalverteilung erfolgte die statistische Analyse auf signifikante Unterschiede der unabhängigen Variablen zwischen den Kohorten mit Hilfe des ungepaarten student's t-test. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung von unabhängigen, nicht-parametrischen Variablen eingesetzt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) respektive standard error mean (SEM) oder als Median mit Minimal (Min)- und Maximalwert (Max) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  festgelegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde exakt angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Deskriptive Statistik der Kohorten

An der Studie nahmen insgesamt 20 gesunde Probanden und 19 Patienten mit Rheumatoider Arthritis teil (s. Tabelle 1). Im Hinblick auf die Geschlechterverteilung sowie das mediane Alter zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Im Mittel waren 80 % der gesunden Spender, respektive 79 % der RA Patienten Frauen. Das Mediane Alter der gesunden Probanden betrug 60, das der Patienten 64 Jahre (kein signifikanter Unterschied:  $p = 0.119$ ). Die überwiegende Mehrheit der Patienten (79 %) hatte eine seropositive RA. 79 % der Patienten wurden mit dem DMARD Methotrexat therapiert und 68 % erhielten eine orale Glukokortikoidtherapie. Drei Patienten wurden mit einem Biologikum therapiert. Davon erhielt ein Patient eine B-Zell-depletierende Therapie, einer eine Inhibition der T-Zell-Kostimulation (Abatacept) und ein weiterer Patient befand sich unter Therapie mit einem JAK-Kinase3-Inhibitor.

Parameter		HD	RA
Anzahl n		20	19
Geschlecht n (%)	weiblich	16 (80)	15 (79)
	männlich	4 (20)	4 (21)
Alter in Jahren (MW $\pm$ SD)		60 $\pm$ 10	64 $\pm$ 12
Dauer der RA in Jahren (MW $\pm$ SD)			9 $\pm$ 12
Anti-CCP-Antikörper n (%)	positiv		15 (79)
	negativ		4 (21)
Rheumafaktoren n (%)	positiv		15 (79)
	negativ		4 (21)
orale Glukokortikoidtherapie n (%)			13 (68)
DMARD n (%)	MTX		15 (79)
Biologika n (%)	Rituximab		1(5)
	Abatacept		1 (5)
	JAK-3-Inhibitor		1(5)

Tabelle 1: Deskriptive Statistik der gesunden Probanden (HD) und Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA). Dargestellt ist jeweils die absolute Anzahl, die relative in Prozent sowie der Mittelwert (MW)  $\pm$  der Standardabweichung (SD). DMARD = disease modifying antirheumatic drug, MTX = Methotrexat, JAK-3 = Janus Kinase 3, CCP = cyclic citrullinated peptide.

### 3.2 Expression der mRNA von TNF, TACE, TIMP-3 und PR-3 in Monozyten

Zur Aufklärung, ob eine gesteigerte proinflammatorische Aktivität von RA Monozyten sich bereits auf Ebene der mRNA Expression manifestiert, wurden die Expressionslevel von TNF, TACE, TIMP-3 und PR-3 in Monozyten von neun RA Patienten und sieben gesunden Spendern mit Hilfe von quantitativer Real Time PCR bestimmt.

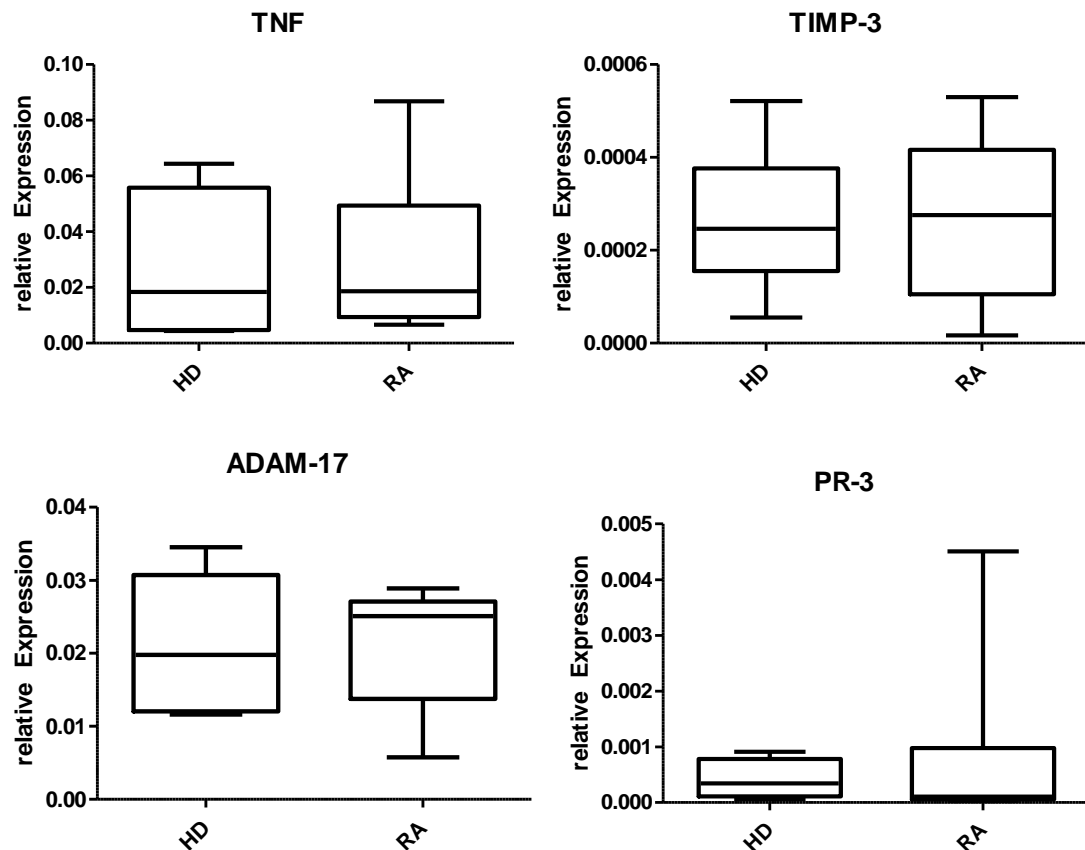


Abbildung 3: Expressionslevel von TNF, PR-3, TIMP-3 und ADAM-17 mRNA in Monozyten gesunder Spender und RA Patienten. Monozyten wurden aus peripherem Blut von gesunden Spendern (n=7) und RA Patienten (n=9) mit negativer Bead Separation gewonnen und die Expression der mRNA von TNF, ADAM-17, TIMP-3 und PR-3 wurde nach Umschreiben in cDNA mit Hilfe einer quantitativen Real Time PCR bestimmt. Es wurde jeweils der Mean aus einem Triplet berechnet. Die mRNA Level wurden mittels  $\Delta\text{Ct}$  Methode für die Expression von GAPDH normalisiert. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mit dem Student's T-Test. Bezüglich der mRNA Expression sowohl von TNF als auch TIMP-3, ADAM-17 und PR-3 bestand zwischen gesunden Spendern und Patienten mit RA kein signifikanter Unterschied.

Die Expression von TNF mRNA war sowohl in Monozyten gesunder Spender als auch von RA Patienten relativ gering. Es bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen (relative Expression von TNF mRNA:  $0,02586 \pm 0,0093$  HD vs  $0,02986 \pm 0,009$ RA,  $p = 0,77$  ungepaarter student's t- test).

Unstimulierte Monozyten von RA Patienten und gesunden Spendern exprimierten TIMP-3 in geringem Ausmaß. Die Expression war in beiden Gruppen identisch (relative Expression von TIMP-3 mRNA mittels  $\Delta C_t$  auf GAPDH normalisiert:  $0,00027 \pm 0,000057$  HD vs  $0,00027 \pm 0,0000529$  RA,  $p = 0,96$  ungepaarter student's t- test).

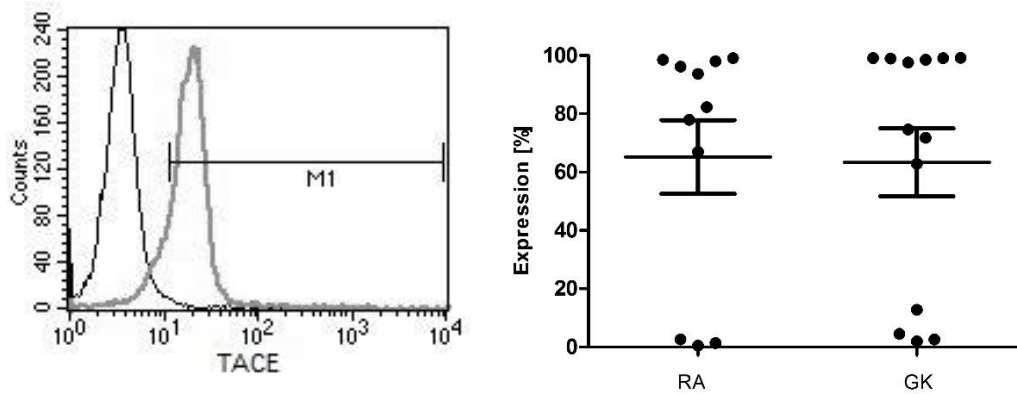
Monozyten von RA Patienten und gesunden exprimierten ADAM-17 bzw. TACE mRNA vergleichsweise niedrig. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht beschrieben werden (relative Expression von ADAM-17 mRNA:  $0,02071 \pm 0,003451$  HD vs  $0,02106 \pm 0,002674$  RA,  $p = 0,9349$  ungepaarter student's t-test).

Die relative Expression von PR-3 war sowohl in Monozyten von RA Patienten als auch von gesunden Spendern sehr gering. Auch hier zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen (relative Expression von PR-3 mRNA:  $0,0004327 \pm 0,0001295$  HD vs  $0,0008226 \pm 0,0004814$  RA,  $p = 0,6065$  Mann-Whitney-U-Test).

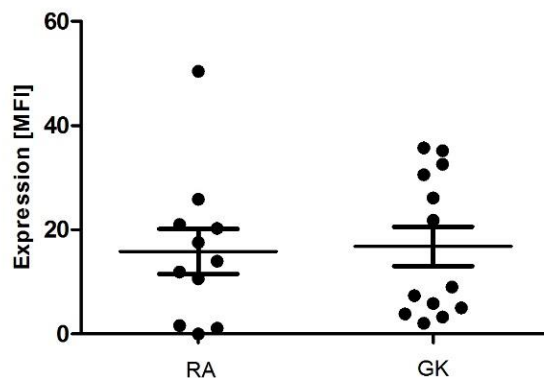
### 3.3 Expression von TACE auf Monozyten

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits die Expression von tmTNF von Monozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei konnten Unterschiede in der Expression von membranständigem TNF zwischen Monozyten von RA Patienten und gesunden Spendern beschrieben werden. Monozyten von RA Patienten exprimierten signifikant mehr tmTNF (94).

In der vorliegenden Arbeit wurden Monozyten von RA Patienten und gesunden Spendern sofort nach der Blutentnahme isoliert und mit Fluoreszenzfarbstoff (PE) markierten Antikörpern gegen TACE/ADAM-17 inkubiert. Eine Isotypkontrolle wurde jeweils mitgeführt. Die Bestimmung der Expression von membranständiger TACE erfolgte anschließend im Durchflusszytometer. Es zeigte sich, dass Monozyten von gesunden Spendern als auch von RA Patienten TACE auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zwischen den Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied (Median Fluoreszenz Intensität [MFI]:  $15,82 \pm 4,332$  RA vs.  $16,80 \pm 3,773$  GK,  $p = 0,643$  Mann Whitney Test). Im Mittel waren 63,37 % der CD14+ Zellen der gesunden Spender positiv für den Oberflächenmarker TACE ( $63,37 \% \pm 11,66$ ). Durchschnittlich 65,21 % der Monozyten von RA Patienten exprimierten TACE ( $p = 0,6638$  Mann Whitney Test).



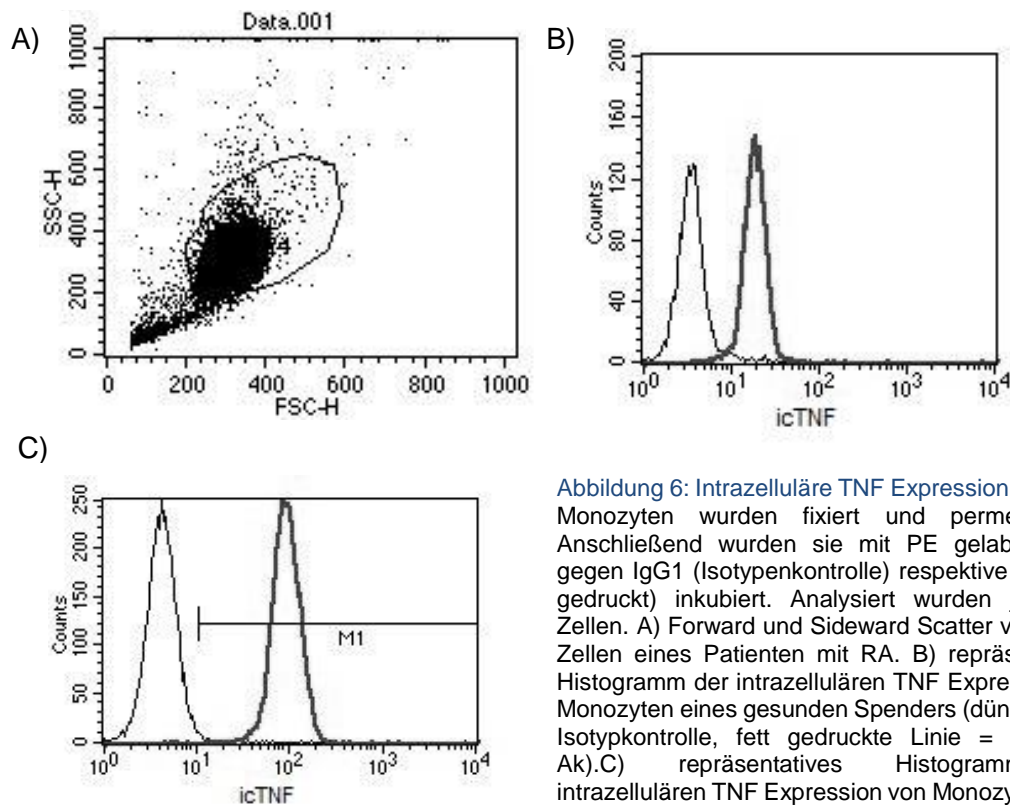
**Abbildung 4: TACE Expression [relative Anzahl in %] auf Monozyten gesunder Spender und RA Patienten**  
Jeweils  $2 \times 10^5$  Monozyten wurden aus peripherem Blut gesunder Spender (GK,  $n=13$ ) und RA Patienten ( $n=11$ ) mit negativer Bead Separation gewonnen und anschließend mit PE gelabelten Antikörpern gegen IgG1 (Isotypenkontrolle) und TACE gefärbt. Die FACS Analyse auf membranständiges TACE erfolgte an 10000 Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm (schwarz = Isotyp IgG1 Kontrolle, grau = TACE) sowie die relative Anzahl der TACE exprimierenden Monozyten in Prozent.



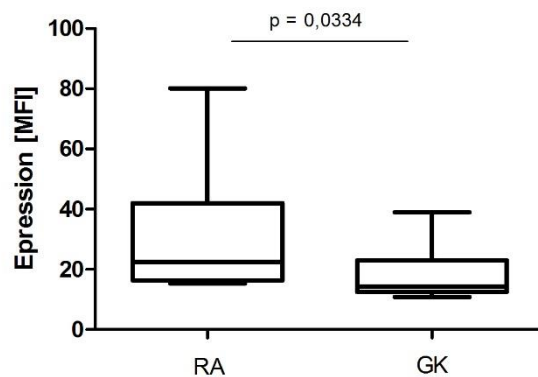
**Abbildung 5: TACE Expression [MFI] auf Monozyten gesunder Spender und RA Patienten**  
Jeweils  $2 \times 10^5$  Monozyten wurden aus peripherem Blut gesunder Spender ( $n=13$ ) und RA Patienten ( $n=11$ ) mit negativer Bead Separation gewonnen und anschließend mit PE gelabelten Antikörpern gegen IgG1 (Isotypenkontrolle) und TACE gefärbt. Die FACS Analyse auf membranständiges TACE erfolgte an 10000 Zellen. Die TACE Expression der Monozyten jedes Probanden respektive Patienten ist als Median der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben (GK = gesunder Spender).

### 3.4 Expression von intrazellulärem TNF, TIMP-3 und PR-3 in Monozyten

Monozyten von Patienten mit früher RA vor Therapiebeginn mit DMARDs zeigen eine verstärkte TNF Produktion (61). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Monozyten von RA Patienten vermehrt intrazelluläres TNF exprimieren. Weiterhin sollte die intrazelluläre Expression von regulatorischen Proteinen bestimmt werden. Hierzu wurden Monozyten nach der Blutentnahme von gesunden Spendern sowie von RA Patienten isoliert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit PE oder FITC gelabelten Antikörpern gegen TNF, TIMP-3 und PR-3 respektive den entsprechenden Isotypen inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert.



**Abbildung 6: Intrazelluläre TNF Expression.** Je  $2 \times 10^5$  Monozyten wurden fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit PE gelabelten AK gegen IgG1 (Isotypenkontrolle) respektive TNF (fett gedruckt) inkubiert. Analysiert wurden je 10000 Zellen. A) Forward und Sideward Scatter von 10000 Zellen eines Patienten mit RA. B) repräsentatives Histogramm der intrazellulären TNF Expression von Monozyten eines gesunden Spenders (dünne Linie = Isotypkontrolle, fett gedruckte Linie = anti-TNF-Ak). C) repräsentatives Histogramm der intrazellulären TNF Expression von Monozyten eines RA Patienten (dünne Linie = Isotypkontrolle, fett gedruckte Linie = anti-TNF-Ak).



**Abbildung 7: intrazelluläre Expression von TNF in Monozyten von RA Patienten und gesunden Spendern.** Monozyten von RA Patienten ( $n=11$ ) und gesunden Spendern (GK,  $n=9$ ) wurden fixiert und permeabilisiert und mit PE gelabelten Anti-TNF AK gefärbt. Dargestellt ist der Median der mittleren Fluoreszenz Intensität. Monozyten von RA Patienten exprimierten signifikant mehr intrazelluläres TNF ( $p = 0,0334$ ).

Sowohl Monozyten von gesunden Spendern als auch von RA Patienten exprimieren gemittelt zu 98% intrazelluläres TNF. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied (relativer Anteil TNF exprimierender Zellen in %:  $97,79 \pm 0,853$  HD vs.  $97,95 \pm 0,833$  RA,  $p = 0,595$  Mann Whitney Test). Monozyten von RA Patienten exprimierten jedoch signifikant mehr TNF intrazellulär im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Median Fluoreszenz:  $18,44 \pm 2,995$  GK vs.  $31,06 \pm 5,828$  RA,  $p = 0,0334$  Mann Whitney Test).

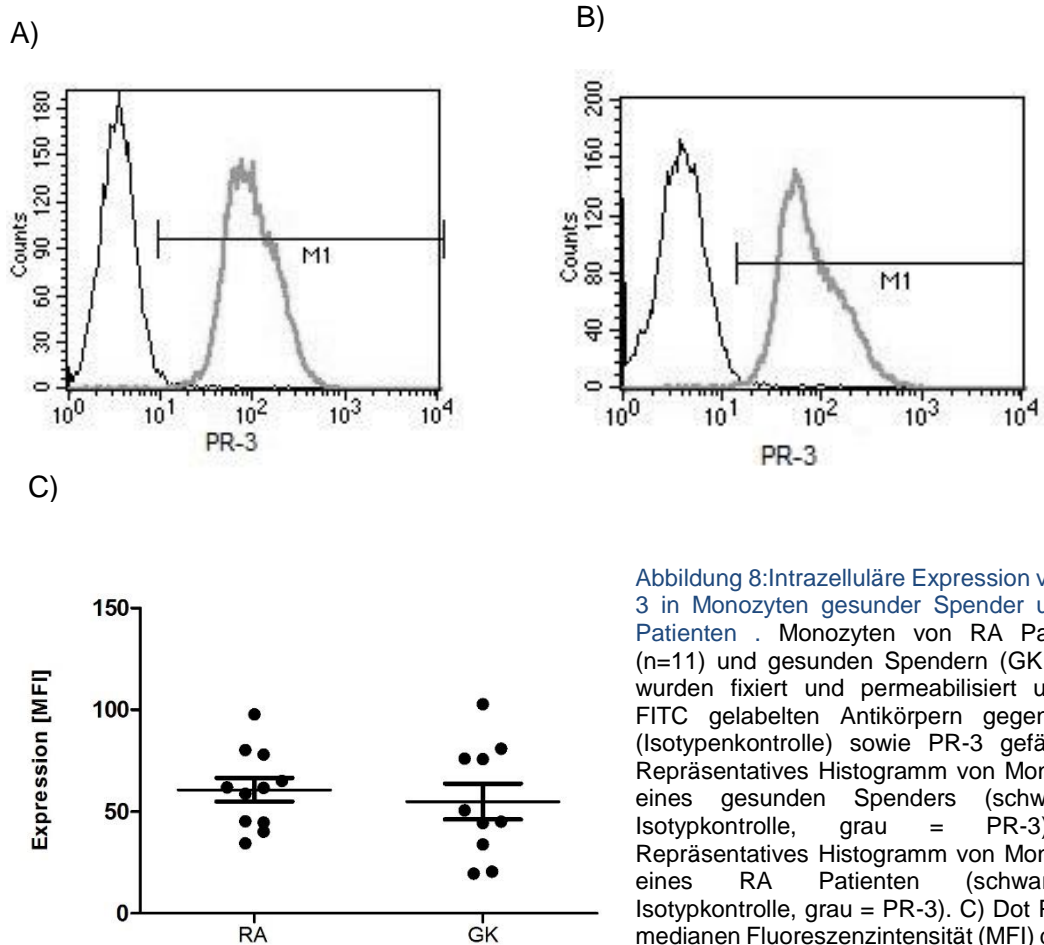
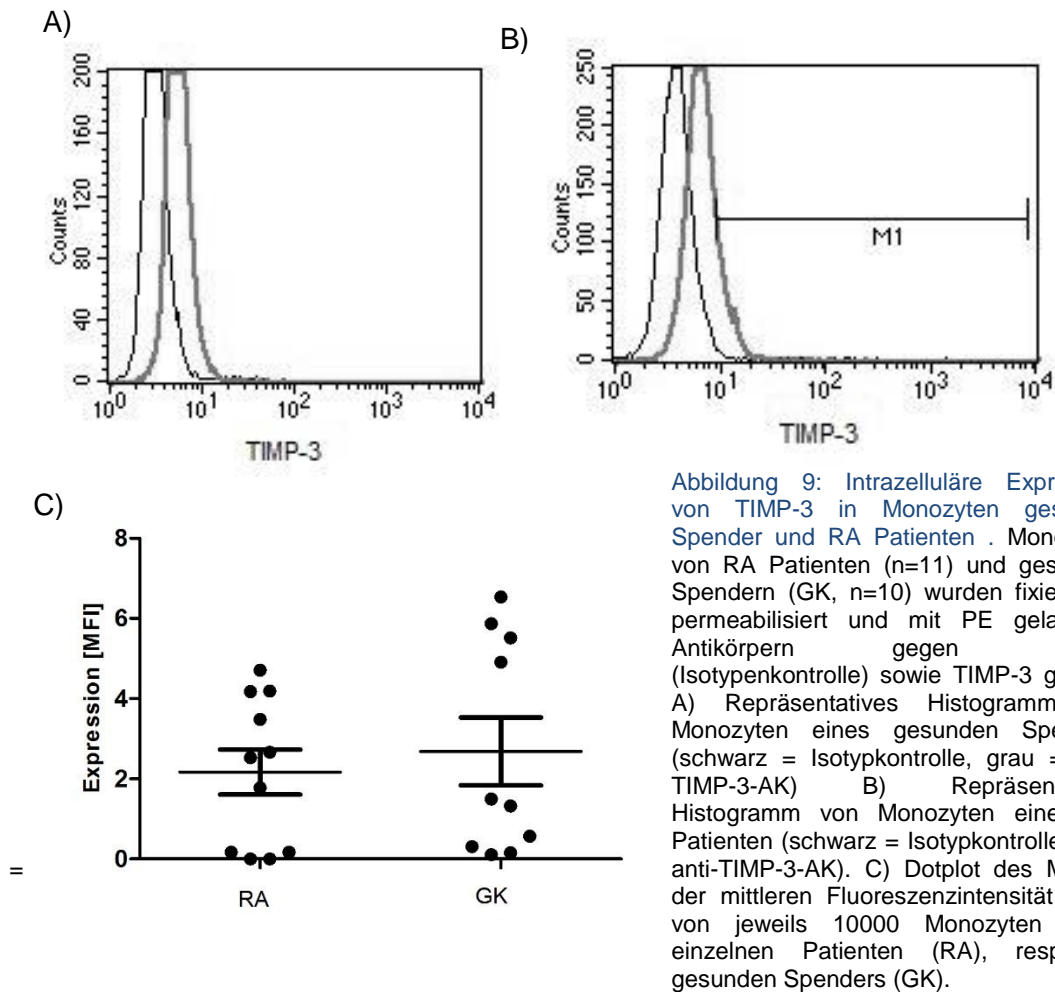


Abbildung 8: Intrazelluläre Expression von PR-3 in Monozyten gesunder Spender und RA Patienten. Monozyten von RA Patienten (n=11) und gesunden Spendern (GK, n=10) wurden fixiert und permeabilisiert und mit FITC gelabelten Antikörpern gegen IgG1 (Isotypkontrolle) sowie PR-3 gefärbt. A) Repräsentatives Histogramm von Monozyten eines gesunden Spenders (schwarz = Isotypkontrolle, grau = PR-3). B) Repräsentatives Histogramm von Monozyten eines RA Patienten (schwarz = Isotypkontrolle, grau = PR-3). C) Dot Plot der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) der PR-3 Expression (MFI) von jeweils 10000

Monozyten jedes einzelnen Patienten respektive gesunden Spenders (GK). Dargestellt sind der Median (horizontale Linie) sowie der Standardfehler (Antennen).

Durchschnittlich 97 % der Monozyten von gesunden Spendern sowie 98 % der Monozyten von RA Patienten exprimierten PR-3 intrazellulär. Es bestand kein signifikanter Unterschied (relativer Anteil der PR-3+/CD14+ Zellen in %:  $96,64 \pm 1,647$  HD vs.  $97,70 \pm 1,456$  RA,  $p = 0,481$ ). Dabei war die Expression der PR-3 moderat mit einem MFI von  $54,97 \pm 8,789$  der CD14+ Zellen gesunder Spender, sowie  $60,74 \pm 5,784$  der CD14+ von RA Patienten. Es lag keine signifikante Differenz zwischen den Populationen vor ( $p = 0,583$ ).





Der Anteil der Monozyten von gesunden Spendern, die intrazellulär TIMP-3 exprimieren lag gemittelt bei 23 %, jedoch mit einer ausgeprägten interindividuellen Varianz ( $23, 12 \pm 9,327$ ). Im Vergleich zeigten lediglich 8,78 % der CD14+ Zellen von RA Patienten eine TIMP-3 Expression ( $8,781 \pm 2,680$ ). Auf Grund der großen Varianz war der Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,138$  ungepaarter Student's t Test). Gemittelt zeigten sowohl die Monozyten von Gesunden als auch von RA Patienten eine geringe TIMP-3 Expression (MFI  $2,68 \pm 0,846$  HD vs.  $2,17 \pm 0,558$  RA,  $p = 0,614$  ungepaarter Student's t-Test) ohne signifikante Differenz. Allerdings zeigte die Subanalyse von den RA Patienten und gesunden Kontrollen, deren Monozyten TIMP-3 exprimierten, dass die CD14+ Zellen der Gesunden hochsignifikant mehr TIMP-3 exprimierten als die der RA Patienten (MFI  $5,71 \pm 0,340$  HD vs.  $3,82 \pm 0,377$  RA,  $p = 0,0098$  ungepaarter t-Test mit Welch Correction).

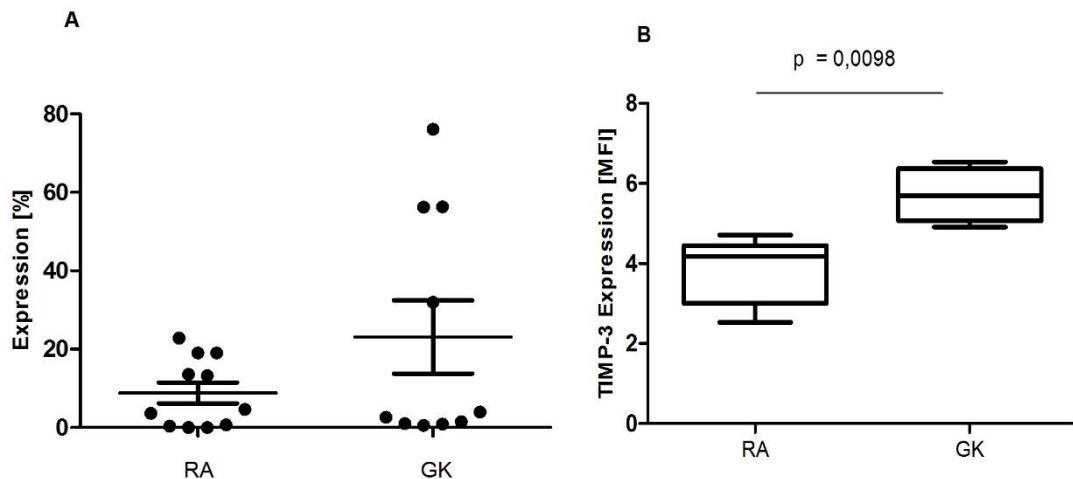


Abbildung 10: : Quantitative Intrazelluläre Expression von TIMP-3 in TIMP-3+ Monozyten gesunder Spender und RA Patienten . Monozyten von RA Patienten (n=11) und gesunden Spendern (GK, n=10) wurden fixiert und permeabilisiert und mit PE gelabelten Antikörpern gegen IgG2A (Isotypenkontrolle) sowie TIMP-3 gefärbt. A: relative Anzahl der TIMP-3 exprimierenden Monozyten in Prozent. 23 % der RA Monozyten und 8,78 % der Monozyten gesunder Spender exprimierten TIMP-3 ( $p = 0,138$ ). B: Median der Fluoreszenz Intensität [MFI] der TIMP-3 Expression der TIMP-3+ Monozyten (RA: n= 5; GK: n=4). Der Vergleich der RA Patienten und gesunden Spender, deren Monozyten TIMP-3 exprimieren, zeigt, dass Monozyten gesunder Spender hochsignifikant mehr TIMP-3 exprimieren ( $p=0,0098$ , t-Test mit Welch Correction)

### 3.5 Sekretion von TNF und TNFR2 von Monozyten

Eine gesteigerte TNF Produktion von Monozyten von RA Patienten konnte bisher bei früher RA beschrieben werden (61). Andere Arbeiten ergaben eine veränderte Kinetik der TNF Sekretion nach Stimulierung durch LPS, ohne Differenzen in der absoluten Quantität zu finden (100). In der vorliegenden Arbeit wurden frisch isolierte Monozyten von RA Patienten und Gesunden Spendern für 16h in der Anwesenheit von LPS oder unstimuliert kultiviert. Die Überstände wurden anschließend mit Hilfe eines ELISA sowohl auf lösliches TNF als auch TNFR2 untersucht.

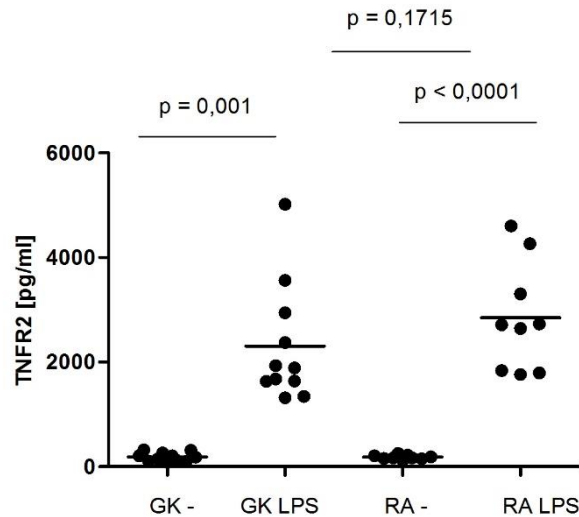


Abbildung 11: TNFR2 Shedding von Monozyten gesunder Spender (GK) und RA Patienten. Je Patient bzw. Spender wurden  $8 \times 10^5$  Monozyten aus peripherem Blut mit negativer Bead Separation gewonnen und zu je  $2 \times 10^5$  Zellen je Well mit jeweils 200  $\mu$ l 10% FKS haltigem und mit PS versetztem RPMI für 16 Stunden bei 37° C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Hälfte der Monozyten mit LPS (100ng/ml) stimuliert. Die TNFR2 Konzentration [pg/ml] der Überstände wurde mit einem kommerziellen ELISA bestimmt. Dargestellt ist die mittlere

Zytokinkonzentration der unstimulierten und stimulierten Monozyten der RA Patienten, respektive gesunden Spender (GK).

Sowohl Monozyten von gesunden Spendern als auch von RA Patienten zeigten eine niedrige basales TNFR2 Shedding, das sich nicht signifikant unterschied (Mean TNFR2 [pg/ml]  $187,1 \pm 25,01$  HD vs.  $182,2 \pm 13,15$  RA,  $p = 0,874$  Ungepaarter Student's t-Test). Monozyten von Patienten und Gesunden, die zuvor mit LPS stimuliert wurden zeigten eine deutliche, hochsignifikant gesteigerte TNFR2 Sekretion im Vergleich zu unstimulierten Monozyten (Gesunde: Mean TNFR2[pg/ml]  $187,1 \pm 25,01$  HD vs.  $2302 \pm 341,7$  HD LPS,  $p = 0,0010$  Wilcoxon signed rank Test; RA: Mean TNFR2 [pg/ml]  $182,2 \pm 13,15$  RA vs.  $2849 \pm 346,9$ ,  $p < 0,0001$ , gepaarter Student's t-Test). Signifikante Unterschiede hinsichtlich des TNFR2 Shedding nach LPS Stimulation zeigten sich zwischen Monozyten von Gesunden und Patienten mit RA nicht. Allerdings gab es einen Hinweis eines vermehrten TNFR2 Shedding der RA Monozyten (Mean TNFR2 [pg/ml]  $2302 \pm 341,7$  HD vs.  $2849 \pm 346,9$  RA,  $p = 0,1715$  Mann Whitney Test).

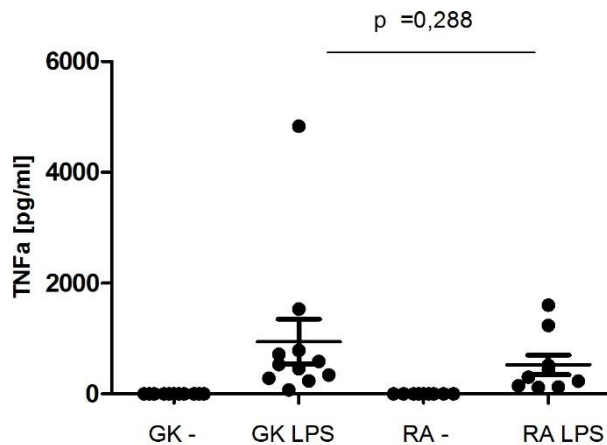
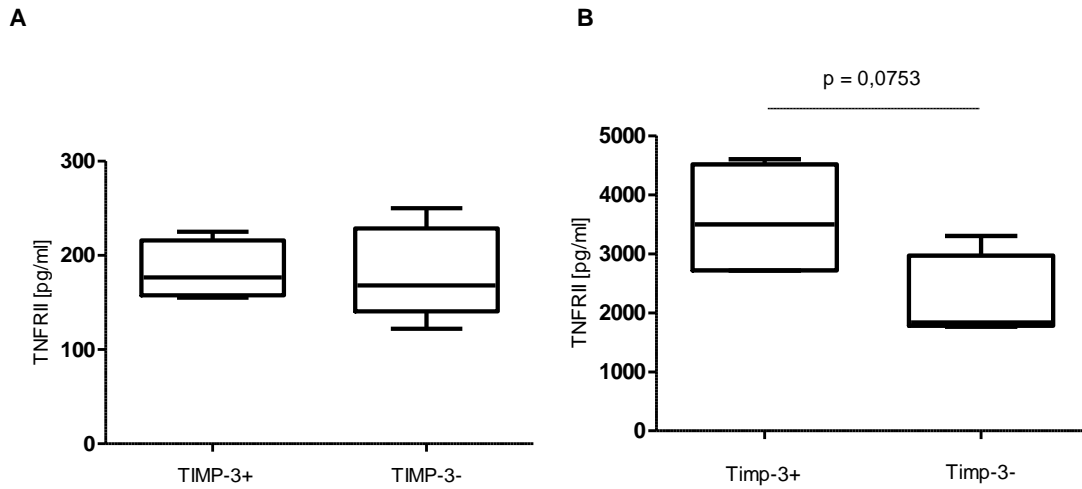


Abbildung 12: TNF Sekretion von Monozyten gesunder Spender und RA Patienten. Je Patient bzw. Spender wurden  $8 \times 10^5$  Monozyten aus peripherem Blut mit negativer Bead Separation gewonnen und zu je  $2 \times 10^5$  Zellen je Well mit jeweils 200  $\mu$ l 10% FKS haltigem und mit PS versetztem RPMI für 16 Stunden bei 37° C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Hälfte der Monozyten mit LPS (100ng/ml) stimuliert. Die TNFR2 Konzentration [pg/ml] der Überstände wurde mit einem kommerziellen ELISA bestimmt. Dargestellt ist die mittlere Zytokinkonzentration der unstimulierten und stimulierten Monozyten der RA

Patienten, respektive gesunden Spender (HD). Unstimulierte Monozyten sezernierten keine detektierbaren Mengen an TNF. Nach Stimulation zeigten Monozyten gesunder Spender (GK) und RA Monozyten eine deutliche TNF Sekretion. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht.

Im Gegensatz zu TNFR2, sezernierten unstimulierte Monozyten von gesunden Spendern und von RA Patienten keine detektierbaren Mengen an TNF. Nach Stimulation durch LPS zeigten beide Populationen eine deutliche TNF Sekretion. Innerhalb der Gruppen zeigten sich dabei erhebliche Schwankungen. Hinsichtlich der absoluten TNF Produktion nach 16 h bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen CD14+ Zellen von RA Patienten und Gesunden (Mean TNF[pg/ml]  $943,9 \pm 406,1$  HD vs.  $525,5 \pm 178,2$  RA,  $p = 0,288$  Mann Whitney Test).

Der Vergleich der RA Patienten, deren Monozyten zum Teil TIMP-3 exprimierten mit RA Patienten, deren Monozyten kein TIMP-3 exprimierten zeigte, dass die Monozyten der Spender mit TIMP-3 Expression ein gesteigertes TNFR2 Shedding nach Stimulation mit LPS aufwies. Der Unterschied erreichte jedoch auf Grund der interindividuellen Varianz und der kleinen Stichprobe nicht das Signifikanzniveau (Mean TNFR2 [pg/ml] :  $2267 \pm 305,7$  TIMP-3- vs.  $3576 \pm 498,6$  TIMP-3+,  $p = 0,0753$  Ungepaarter Student's T-Test nach Welch Correction). Es zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf die TIMP-3 Expression im Hinblick auf das basale TNFR2 Shedding (Mean TNFR2 [pg/ml]:  $181,2 \pm 21,88$  TIMP-3- vs.  $183,3 \pm 15,54$  TIMP-3+,  $p = 0,9416$  Ungepaarter Student's t-Test nach Welch Correction). Auch im Hinblick auf die TNF Sekretion nach Stimulation durch LPS unterschieden sich die Monozyten der TIMP-3 positiven Spender nicht von den negativen (Mean TNF[pg/ml]:  $597 \pm 261,3$  TIMP-3- vs.  $435,8 \pm 268,4$  TIMP-3+,  $p = 0,6819$  Ungepaarter Student's t-Test nach Welch Correction).



**Abbildung 13 a,b: Vergleich des sTNFR2 Shedding von TIMP-3+ Monozyten von RA Patienten.** Monozyten von RA Patienten wurden für 16 h in 200 µl 10% FKS haltigem RPMI bei 37° C inkubiert, einmal ohne (A) und einmal mit LPS Stimulation (100ng/ml) (B). Die Konzentration von TNFRII wurde in Überständen mit Hilfe eines kommerziellen ELISA (Quantikine R& D Systems) quantifiziert. Zu sehen sind die Ergebnisse von 9 unabhängigen Experimenten. Es wurde unterteilt in RA Patienten, deren Monozyten TIMP-3 exprimieren (TIMP-3+, n=4) und Patienten, deren Monozyten kein TIMP-3 exprimieren (TIMP-3-, n=5). Monozyten von RA Patienten mit TIMP-3 positiven Zellen zeigten ein erhöhtes TNFR2 Shedding nach LPS Stimulation.  $p = 0,0753$  Student's t-Test nach Welch Correction.

#### **4. Diskussion**

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronische Polyarthritis mit Affektion vor allem der kleinen peripheren Gelenke der Hände und Füße. Pathophysiologisch kommt es durch autoimmunologische Reaktionen zu einer Synovialitis. Grundlage hierfür sind Dysregulationen zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Der Auslöser für diese Fehlsteuerungen mit konsekutiver Zerstörung des Gelenkknorpels bleibt bisher unaufgeklärt. Durch Aktivierung von T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen werden hohe Mengen an proinflammatorischen Zytokinen sezerniert, die sowohl in der Synovialis als auch im Serum von Patienten detektierbar sind. Im Mittelpunkt steht dabei das TNF, welches im Rahmen der Biologika zum Hauptangriffspunkt moderner Therapieregimes geworden ist.

Der Tumornekrosefaktor wird vor allem von aktivierten Monozyten produziert. In Studien konnte gezeigt werden, dass Monozyten von RA Patienten eine dysregulierte TNF Produktion aufweisen (59,61,101). Die Ergebnisse sind jedoch zum Teil widersprüchlich. Eine potentielle Rolle bei der Fehlsteuerung könnten dabei das Shedding durch die Metalloproteinase TACE /ADAM-17 als auch durch die PR-3 und ein Inhibitor von TACE, TIMP-3 spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expression und Sekretion von TNF sowie der an der Prozessierung des TNF beteiligten Proteine TACE , PR-3 und TIMP-3 in Monozyten von RA Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern untersucht.

##### **4.1 Expression von TNF sowie regulatorischer Moleküle auf mRNA Ebene**

Die Regulation des Tumornekrosefaktors manifestiert sich sowohl auf transkriptioneller als auch posttranskriptioneller Ebene (102). Bisher konnten erhöhte mRNA Expressionslevel in PBMCs von RA Patienten u.a. für IL-6, IL-8, und IL-10 beschrieben werden. Die Expression von TNF mRNA in RA PBMCs scheint hingegen nicht gesteigert zu sein im Vergleich mit PBMCs gesunder Spender (103). In der vorliegenden Arbeit war die Expression von TNF mRNA sowohl in unstimulierten Monozyten gesunder Spender als auch von RA Patienten niedrig und ohne signifikante Differenz zwischen den Gruppen. Diese Beobachtung deckt sich mit den bisherigen Studien zur Zytokin mRNA Expression von RA Monozyten aus dem peripheren Blut (62). Die erhöhten TNF Spiegel in Seren und vor allem in der Synovialflüssigkeit von RA Patienten sind demnach auf aktivierte Makrophagen in der Synovia betroffener

Gelenke zurückzuführen (104–107) sowie auf eine eventuelle posttranskriptionell gesteigerte TNF Sekretion von peripheren Monozyten (59,61,101).

Da ADAM-17 respektive TACE hauptverantwortlich für das Shedding von tmTNF ist (41), wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob TACE mRNA in Monozyten von RA Patienten hochreguliert ist. Es ist bekannt, dass RA Patienten vermehrt TACE im Knorpelgewebe befallener Gelenke exprimieren (64). Auch in anderen autoimmunologisch vermittelten Erkrankungen scheint die ADAM-17 eine Rolle zu spielen. So konnten Charbonneau und Kollegen in einem Tiermodell der RA eine erhöhte TACE mRNA Expression in Synovialzellen aufzeigen (Charbonneau 2007). In Patienten mit aktiver Multipler Sklerose wurde ebenfalls eine gesteigerte mRNA Expression in PBMCs beschrieben (108). Bohgaki et. al konnten eine erhöhte ADAM-17 mRNA Expression in Monozyten von Patienten mit früher Systemischer Sklerose nachweisen (72). Zur Expression von TACE mRNA in Monozyten von RA Patienten existieren bisher keine publizierten Daten. In der vorliegenden Arbeit wurden unstimulierte Monozyten aus peripherem Blut von RA Patienten und gesunden Spendern mittels quantitativer Real Time PCR auf die mRNA Expression von ADAM-17 untersucht. Sowohl Monozyten von gesunden Spendern als auch von RA Patienten wiesen eine geringe Expression auf. Es zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen. Möglicherweise ist die beschriebene Expression in peripheren Monozyten auf Grund der überwiegend länger bestehenden RA niedrig und nicht hochreguliert. Bohgaki und Kollegen konnten bei Patienten mit chronischer im Gegensatz zu früher Systemischer Sklerose keine erhöhte mRNA Expression mehr feststellen (72). Demnach stellt sich die Frage, ob die Transkription von ADAM-17 in Monozyten von Patienten mit früher RA hochreguliert ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass nur Synovialzellen und Makrophagen in betroffenen Gelenken vermehrt ADAM-17 mRNA exprimieren, da vor allem in der Synovialflüssigkeit hohe TNF Spiegel gemessen werden (29). Die beobachtete niedrige Expression von ADAM-17 mRNA in RA Monozyten passt zur ebenfalls geringen transmembranen Expression, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird.

TIMP-3 gilt als physiologischer Checkpoint für inflammatorische Prozesse (109). Makrophagen mit verminderter TIMP-3 mRNA Expression zeigen eine Differenzierung zu dem proinflammatorischen M1 Makrophagen. Dabei verfügen TIMP-3 defiziente Makrophagen über einen proinflammatorischen Phänotyp und sind vermehrt resistent gegen Apoptose, während eine Überexpression von TIMP-3 zu einer antiinflammatorischen Differenzierung führt (110). Smookler und Kollegen konnten

erstmalig 2006 in Makrophagen von wildtype Mäusen TIMP-3 mRNA Expression nachweisen. Darüber hinaus zeigten sie, dass Makrophagen von *timp-3*<sup>-/-</sup> Knockout Mäusen vermehrt TNF $\alpha$  nach Stimulation mit LPS sezernieren im Vergleich zu wildtype Mäusen (111). Auch in der Pathophysiologie der Atherosklerose spielt TIMP-3 eine Rolle. In einem Mausmodell für Atherosklerose zeigten transgene Mäuse mit einer Überexpression von TIMP-3 in Makrophagen eine verminderte Progression der Atherosklerose (112). Weiterhin weisen humane Monozyten von Patienten mit erhöhter Insulinresistenz und Atherosklerose eine verminderte TIMP-3 mRNA Expression auf. Die herunterregulierte TIMP-3 Expression korrelierte mit einer gesteigerten Aktivität von ADAM-17 (113). Des Weiteren nimmt TIMP-3 auch eine bedeutende Funktion in der Pathophysiologie der Arthritis ein. So konnten Mahmoodi und Kollegen in einem Mausmodell für Arthritis in der frühen Phase der Pathologie deutlich erhöhte TNF Konzentrationen in Serum von TIMP-3 <sup>-/-</sup> Knockout im Vergleich zu wildtype Mäusen nachweisen. Die hohen TNF Spiegel führten sie auf eine Enthemmung von TACE zurück (114). Publierte Daten zur TIMP-3 mRNA Expression von Monozyten von RA Patienten sind bisher nicht publiziert. In der vorliegenden Studie wurde Monozyten von gesunden Spendern und RA Patienten mittels quantitativer Real Time PCR auf die mRNA Expression von TIMP-3 hin untersucht. Dabei konnte in beiden Gruppen eine niedrige Expression nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen den Populationen bestand dabei nicht. Interessanterweise zeigten Monozyten von RA Patienten jedoch eine tendenziell verminderte Anzahl TIMP-3 exprimierender Monozyten in FACS Analysen (s.u.). Die Monozyten gesunder Spender, die TIMP-3 exprimierten zeigten eine deutlich höhere Expression auf Proteinebene in den FACS Untersuchungen [MFI] im Vergleich zu den Monozyten von RA Patienten, die TIMP-3 exprimierten. Demnach wäre eine Differenzierung nach TIMP-3<sup>+</sup> Zellen im Rahmen der mRNA Expressionsanalysen interessant. Möglicherweise ist die mRNA Expression bei TIMP-3 positiven Monozyten von Gesunden im Vergleich zu RA Monozyten gesteigert.

Eine Beteiligung der Proteinase 3 bei der Prozessierung des TNF wird diskutiert. Es gibt Hinweise, dass PR-3 neben der TACE für das Shedding von tmTNF verantwortlich sein könnte. Die Ergebnisse von bisherigen Studien sind jedoch widersprüchlich (88–90,115). Bisher ist man davon ausgegangen, dass die PR-3 vor allem während der Myelopoese transkribiert wird, die Transkription in reifen Leukozyten physiologisch jedoch herunter reguliert ist (116). Aktuellere Studien stellen dieses Paradigma in Frage. So konnten Just et. al eine gesteigerte PR-3 mRNA Expression in Monozyten von Patienten mit Zystischer Fibrose während pulmonaler Exazerbationen beschreiben



(117). Ohlsson und Kollegen sowie Yang et. al fanden eine gesteigerte Expression von PR-3 mRNA in Monozyten von Patienten mit ANCA assoziierter Vaskulitis im Vergleich mit gesunden Spendern und Patienten mit Systemischem Lupus erythematoses (118,119). In der vorliegenden Studie konnte eine äußerst geringe Expression von PR-3 mRNA in Monozyten von RA Patienten und gesunden Spendern beschrieben werden. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression zwischen den Gruppen bestand nicht. Zur Proteinase-3 mRNA Expression von RA Monozyten existieren derzeit keine publizierten Daten. Die Ergebnisse der Studie entsprechen jedoch den Erwartungen, da auch bei SLE Patienten (s.o.) keine signifikant gesteigerte Expression beschrieben wurde. Allerdings konnten von Zhou et. al eine Hochregulierung der PR-3 Expression von PBMCs nach Stimulation mit TNF beobachten (120). Es wäre demnach denkbar, dass aktivierte synoviale Makrophagen von RA Patienten in betroffenen Gelenken vermehrt PR-3 transkribieren.

#### **4.2 Expression von tmTNF und TACE auf der Oberfläche von Monozyten**

Membranständiges TNF scheint eine Rolle in der direkten Zell-Zell Interaktion zwischen beispielsweise Monozyten und T-Lymphozyten zu spielen (39). Dabei wird dem tmTNF sowohl die Funktion eines Liganden als auch eines Rezeptors im Rahmen des Reverse Signalling zugeschrieben (94). Daten zur Expression des tmTNF auf humanen Monozyten fallen unterschiedlich aus. Während Meusch et. al, sowie Robertshaw und Brennan membranständiges TNF auch auf unstimulierten Monozyten nachweisen konnten (94,121), gelang dies anderen Arbeitsgruppen nur nach Stimulation mit LPS (31,32). Darüber hinaus konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durch Meusch und Kollegen eine vermehrte Expression bei Monozyten von RA Patienten beschreiben (94).

ADAM-17, auch tumornecrosis factor alpha converting enzyme (TACE) genannt, überführt membranständiges tmTNF in das lösliche sTNF durch proteolytische Spaltung (41). RA Patienten weisen eine gesteigerte TACE Expression im Knorpelgewebe betroffener Gelenke auf (64). Weiterhin wird der TACE die vermehrte Konzentration von TNF in Synovia von RA Patienten zugeschrieben (65) (71). Auf Monozyten wurde bisher nur bei Patienten mit früher Systemischer Sklerose eine erhöhte Expression von TACE beschrieben. Bei Monozyten von RA Patienten gelang dies nicht (72). Bisher bleibt ungeklärt, in wie weit die transmembrane Expression und die enzymatische Aktivität reguliert werden. Zum einen scheint nach Aktivierung von Monozyten, deren TACE Expression herunterreguliert zu werden (121,122). Doedens

et. al fanden außerdem heraus, dass die enzymatische Aktivität der TACE nach Stimulierung mit PMA gesteigert wird (123). Bei der Aktivierung der TACE scheinen im physiologischen Rahmen NO (124) und reaktive Sauerstoffspezies (125) beteiligt zu sein. Entscheidend für die Aktivität der TACE ist möglicherweise eine thiolreiche Prodomaine. Veränderungen dieser Thiolgruppe könnten zur Aktivierung der TACE führen (126). Enzymatisch aktive TACE ist vor allem in cholesterolreichen Regionen, den lipid rafts, lokalisiert (127).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen gezeigt werden, dass unstimulierte Monozyten von RA Patienten und von gesunden Spendern TACE auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dabei zeigten beide Gruppen nur eine niedrige Expression der Metalloproteinase mit einem Median der MFI von 16-17. Zwischen RA Patienten und Gesunden wurde kein Unterschied diesbezüglich gefunden. Auch Bohgaki et. al hatten bei Monozyten sowohl von gesunden Spendern als auch von RA Patienten vergleichbar niedrige Level der TACE ohne signifikante Differenz beschrieben (72). Es bleibt jedoch fraglich, ob die Höhe der Expression von TACE überhaupt eine Aussage über deren Aktivität erlaubt. Die bisherigen Arbeiten zeigen hierzu widersprüchliche Ergebnisse (122–124,127).

#### **4.3 Intrazelluläres Vorkommen von TNF sowie regulatorischer Moleküle in Monozyten**

In der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis nimmt der Tumor Nekrose Faktor als proinflammatorisches Zytokin eine bedeutende Rolle ein. Zu den Hauptproduzenten des TNF werden Monozyten gezählt. Bei RA Patienten sezernieren aktivierte Monozyten vermehrt Mengen an TNF im Vergleich mit gesunden Probanden (60,61). Auch die basale TNF Produktion unstimulierter Monozyten scheint verändert zu sein (59). Die Ursachen für die Dysregulation bleiben bisher unaufgeklärt. Eine Möglichkeit wäre eine gesteigerte basale Produktion von TNF in Monozyten, die sich möglicherweise auch in einer erhöhten Expression an intrazellulärem TNF widerspiegeln würde. Die intrazelluläre Expression von TNF in Monozyten ist bisher allerdings unbefriedigend untersucht. Zamora et. al verglichen gesunde Spender mit RA Patienten vor und nach Therapiebeginn mit Adalimumab, einem monoklonalen Antikörper gegen TNF. Dabei konnten sie zeigen, dass die Expression von intrazellulärem TNF in Monozyten von RA Patienten verglichen mit gesunden erniedrigt war. Die Therapie mit Anti-TNF-Antikörpern hob die intrazelluläre Expression wieder auf Werte von Monozyten gesunder Spender (128). Im Widerspruch hierzu beschrieben Schuerwegh und Kollegen eine Reduktion der intrazellulären TNF

Exprimierung von RA Monozyten nach Initiierung eine Therapie mit anti-TNF-Antikörpern. Die Expression in gesunden Monozyten wurde in dieser Studie jedoch nicht untersucht (129).

In der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre Expression von TNF in unstimulierten Monozyten von RA Patienten und gesunden Spendern analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass im Mittel etwa 98% der CD14+ Zellen intrazelluläres TNF exprimierten. Ein Unterschied zwischen den Gesunden und RA Patienten bestand nicht. Damit lag die Rate icTNF exprimierender Zellen deutlich über der, die Zamora und Kollegen gemessen hatten (HD:  $66,51 \pm 2,4$  vs  $33,16 \pm 4,82$  RA) als auch über der Expression, die Raspe et. al bei stimulierten Monozyten beschrieben hatten (130). Die unstimulierte Vergleichskohorte von Zamora et. al exprimierte darüber hinaus wenig bis kein intrazelluläres TNF (128). Die Ergebnisse entsprechen damit denen, der Studie von Schuerwegh et. al, die auch in unstimulierten Monozyten intrazelluläres TNF bei RA Patienten finden konnten. Eine Vergleichsgruppe mit Monozyten gesunder Spender wurde dabei jedoch nicht analysiert (129). Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass, gemessen am Median der Mean Fluorescence Intensity, die CD14+ Zellen der RA Patienten signifikant mehr intrazelluläres TNF als die Monozyten gesunder Spender exprimierten.

Mögliche Ursachen für die Differenzen zwischen der Studie und der vorliegenden Arbeit könnten in der unterschiedlichen Methodik begründet sein. So analysierten Zamora und Kollegen, sowie Raspe et. al die CD14+ Zellen im Vollblut, nach vorhergehender Stimulierung mit LPS. Eine Separierung der Monozyten wie in der vorliegenden Studie wurde nicht durchgeführt (128). Dabei entspricht eine vermehrte intrazelluläre TNF Expression bei RA Monozyten im Vergleich zu Gesunden eher den Erwartungen. Möglicherweise spiegelt sich hier eine Dysregulation hin zu einer proinflammatorischen basalen Aktivität der RA Monozyten wider, die bereits ohne Stimulation vermehrt TNF produzieren. Ein weiterer Grund könnte eine vermindertes Shedding durch TACE sein, das konsekutiv zur Akkumulation von intrazellulärem TNF führt. Ein weiterer Mechanismus könnte die expandierte proinflammatorische CD14++CD16+ Subpopulation von RA Monozyten im Vergleich zu gesunden liegen, die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durch Rossol et. al beschrieben wurde (91). Die entgegengesetzten Beobachtungen in der Studie von Zamora et. al werden damit begründet, dass die vermehrte TNF Produktion in RA Patienten zu einem negativen Feedbackmechanismus führen könnte und somit die Anzahl der icTNF+ CD14+ Zellen verringert (128). Zur weiteren Aufdeckung der Dysregulation von icTNF in Monozyten

von RA Patienten sind weitere Studien notwendig, auch um die Diskrepanzen zwischen den Arbeiten aufzuklären.

TIMP-3 spielt eine wichtige Rolle in inflammatorischen Prozessen. Dabei hat sie antiinflammatorisches Potenzial und scheint bedeutend für die Resolution von Entzündungen zu sein. So ist bekannt, dass TIMP-3 das Shedding von tmTNF durch die TACE inhibieren kann (74). Weiterhin konnten Brennan et. al 2008 zeigen, dass endogenes TIMP-3 zu einer Akkumulation von katalytisch inaktiver TACE auf der Oberfläche von Monozyten führt. Darüber hinaus beobachteten sie, dass die TIMP-3 Expression in Monozyten durch LPS und IL-10 induziert wird und nach 24 h ein Maximum erreicht (131). Eine verminderte Expression von TIMP-3 in humanen Monozyten wurde erstmals bei Verwandten 1. Grades von Patienten mit Diabetes mellitus Typ II beschrieben. Dies ging mit einer gesteigerten Aktivität der TACE/ADAM-17 einher (82). Daten zur TIMP-3 Expression in Monozyten von RA Patienten fehlen bislang.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Anteil TIMP-3 exprimierender Monozyten bei RA Patienten tendenziell verringert ist im Vergleich zu gesunden Spendern. Die interindividuelle Varianz ist dabei jedoch hoch, so dass es sich auf Grund der relativ kleinen Kohorte um einen Trend ohne Signifikanz handelt. Der Vergleich der TIMP-3 positiven CD14+ Zellen zeigte allerdings, dass TIMP-3+ Monozyten gesunder Spender hochsignifikant mehr TIMP-3 intrazellulär exprimierten als RA Monozyten. Dieses Ergebnis deutet neben der vermehrten intrazellulären TNF Expression der RA Monozyten auf eine dysregulierte basale proinflammatorische Aktivität der RA Monozyten hin. Dies entspricht bisherigen Entdeckungen, dass die TIMP-3 Expression in Makrophagen deren proinflammatorische Aktivität bestimmt (110). So scheinen invasive Schaum Makrophagen eine verminderte TIMP-3 Expression aufzuweisen und eine Rolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose zu spielen (132). In wie fern TIMP-3 negative, respektive niedrig exprimierende Monozyten pathophysiologisch bedeutsam in der rheumatoiden Arthritis sind, bedarf weiterer Aufklärung.

Um zu untersuchen, in wie fern die Proteinase 3 eine Rolle bei der Dysregulation der monozytären TNF Produktion spielt, wurde in der vorliegenden Studie die intrazelluläre TNF Expression mit Hilfe einer FACS Analyse quantifiziert. Bisherige Arbeiten ergaben Hinweise auf eine potentielle Beteiligung der PR-3 bei der TNF Sekretion, die jedoch teils widersprüchlich sind. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass die PR-3 tmTNF proteolytisch spalten kann (89) und eine Inkubation von stimulierten Monozyten

mit PR-3 zu einer vermehrten TNF Sekretion führt (90). Zum anderen zeigten Yard et. al. gegensätzliche Effekte (88). Bei Patienten mit RA wurde bisher die membranständige Expression von PR-3 auf Neutrophilen Granulozyten untersucht. Diese war im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht und durch eine Biologika Therapie mit Anti-TNF-Ak reduziert (133). In Monozyten von Patienten mit zystischer Fibrose konnte eine erhöhte intrazelluläre Expression der PR-3 gezeigt werden. Interessanterweise ergab sich ein positiver Zusammenhang zwischen Expression und Inflammation während Exazerbationen (117). Demnach könnte die intrazelluläre Expression der PR-3 in Monozyten ein weiterer Marker für inflammatorische Aktivität sein. Daten zur Expression von intrazellulärer PR-3 von RA Monozyten fehlen bislang.

Die FACS Analysen der vorliegenden Studie ergaben, dass fast alle Monozyten von RA Patienten und von gesunden Spendern PR-3 exprimieren (HD: 97%, RA 98 %). Dabei zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied in der relativen Anzahl der PR-3 exprimierenden CD14+ Zellen noch in der Quantität der intrazellulären Expression. Dies entspricht der Beobachtung zu membranständiger PR-3 auf Monozyten von Tarzi und Kollegen bei Gesunden und Patienten mit Vaskulitis (92). Dies könnte bedeuten, dass PR-3 keine Rolle in der Zytokinproduktion der RA Monozyten spielt. Wahrscheinlicher ist, dass, wie schon Just et. al. beschrieben, die PR-3 Expression erst im Rahmen akuter inflammatorischer Prozesse hochreguliert wird. Demnach wäre die Expression nur im Zustand eines akuten Schubes der RA erhöht. Hierzu wären Studien mit Monozyten von Patienten vor Therapiebeginn oder während eines Schubes notwendig.

#### **4.4 Sekretion von TNF und TNFR2 durch Monozyten**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sekretion von TNF von Monozyten gesunder Spender und RA Patienten untersucht. Dabei wurden sowohl Überstände unstimulierter Monozyten als auch mit LPS stimulierte Monozyten analysiert. Ohne Stimulation zeigten beide Populationen keine detektierbare TNF Sekretion. Nach Stimulation durch LPS wurden jedoch hohe Mengen an TNF sezerniert. Ein Unterschied zwischen Monozyten gesunder Spender und von RA Patienten bestand dabei nicht. Im Vergleich hierzu hatten Leirisalo-Repo et. al. bei Patienten mit früher RA vor Therapiebeginn mit Biologika eine gesteigerte TNF Sekretion gemessen. Die Sekretionsrate glied sich im Verlauf der Therapie jedoch der von Monozyten gesunder Spender an (61). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie, hatten Liote et. al. eine spontane TNF Sekretion beschrieben. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Monozyten gesunder Spender und RA Patienten (59). Interessanterweise

konnten Fabris und Kollegen ebenfalls keinen Unterschied in der akkumulierten TNF Sekretion nach LPS Stimulation feststellen. Allerdings differierten die Monozyten in der Kinetik der TNF Sekretion. Dabei erreichten RA Monozyten ihre maximale Sekretionsrate früher als Monozyten gesunder Spender. Ruschen et. al. stellten ebenfalls eine veränderte Kinetik hin zu akzellerierter TNF Sekretion ohne Differenz in der akkumulierten Menge an TNF fest (101). Demnach wären in der vorliegenden Arbeit sukzessive Messungen nach 6, 12, 18 und 24 Stunden interessant gewesen. Sicherlich spielt auch die Therapie mit DMARDs und Prednisolon eine Rolle. So könnte die proinflammatorische Aktivität der RA Monozyten herunterreguliert und die Sekretion von TNF dadurch auf das Niveau gesunder Monozyten abgesenkt worden sein.

Neben der sTNF Sekretion wurde auch die Konzentration von löslichem TNFR2 in den Überständen unstimulierter und stimulierter Monozyten quantifiziert. Als membranständiger Rezeptor scheint er vor allem für die Bindung von membranständigem TNF verantwortlich zu sein (54). Aktivierte T-Zellen können so via direkten Zell-Zell Kontakt Monozyten aktivieren(39). Löslicher TNFR2 übt hingegen eine regulatorische Funktion aus. So schwächt es die proinflammatorische Wirkung hoher TNF Konzentrationen über Bindung an sTNF ab und verlängert über Stabilisierung des TNF-Homotrimers gleichzeitig dessen Wirkung (134). Aderka et. al. konnten erhöhte sTNFR Konzentration in Seren von Patienten mit inflammatorischen und neoplastischen Erkrankungen nachweisen (135,136). In RA Patienten wurden ebenfalls erhöhte Konzentrationen in Synovialflüssigkeit betroffener Gelenke als auch im Serum beschrieben (137–139). Das Shedding von sTNFR2 durch Monozyten steigt nach Stimulation durch LPS deutlich an (56).

In der vorliegenden Studie zeigten unstimulierte Monozyten von gesunden als auch von RA Patienten ein niedriges sTNFR2 Shedding. Das Shedding nach Stimulation durch LPS war um den Faktor 12 bei den gesunden und 16 bei den RA Monozyten gesteigert. Die Steigerung war deutlich höher als von Glossop et al (140) beschrieben, entsprach aber in etwa den Beobachtungen von Leeuwenberg und Kollegen (56). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und RA Monozyten. Allerdings zeigte sich ein Trend hin zu einem gesteigerten sTNFR2 Shedding der stimulierten RA Monozyten gegenüber den gesunden. Möglicherweise trägt die gesteigerte Sekretion zu den bisher dokumentierten erhöhten TNFR2 Serum- und Synovialsiegeln der RA Patienten bei. Ein Teil der Patienten war zum Zeitpunkt der Studie unter Therapie mit Glukokortikoiden sowie DMARDS. Da Glukokortikoide das Shedding von sTNFR2 durch Monozyten signifikant abschwächen (141), ist zu

vermuten, dass die gefundene Differenz zwischen den RA Monozyten und den Monozyten gesunder Spender ohne Glukokortikoid Therapie deutlicher ausfällt. Interessanterweise produzierten die Monozyten von RA Patienten, deren Zellen TIMP-3 exprimierten mehr sTNFR2 im Vergleich zu den Monozyten der TIMP-3 negativen Kohorte. Da TACE TNFR2 von der membranständigen Form in die lösliche überführt (66), wäre eigentlich das Gegenteil naheliegender. Denkbar ist, wie schon oben beschrieben, dass die TIMP-3+CD14+ Zellen eine antiinflammatorische Subpopulation der Monozyten darstellen. Das sTNFR2 ist in der Lage, lösliches TNF zu binden und somit eine Stimulation von membranständigen TNF Rezeptoren zu verhindern (134,142).

## **5. Zusammenfassung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

### **Untersuchungen zur TNF in Monozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und gesunden Spendern**

eingereicht von:

Christoph Mathar

angefertigt an:

Universität Leipzig, Department für Innere Medizin, Sektion Rheumatologie, AG Experimentelle Rheumatologie.

betreut von:

Prof. Dr. med. Ulf Wagner und Dr. rer. nat. Manuela Rossol

Juli 2016

Die Rheumatoide Arthritis ist eine inflammatorische Erkrankung mit hoher Prävalenz von etwa 1 % mit Affektion vor allem der kleinen peripheren Gelenke aber auch systemischer Manifestationen. Pathophysiologisch kommt es im Rahmen eines autoimmunologischen Prozesses zu einer verstärkten Migration von Monozyten und Lymphozyten in die Synovialis mit überschießender Produktion proinflammatorischer Zytokine, insbesondere TNF. Die Kaskade aus Entzündungsmediatoren führt unbehandelt zu einer irreversiblen Destruktion des Gelenkknorpels mit konsekutivem Funktionsverlust des Gelenks. Hauptproduzenten von TNF sind neben Synovialzellen vor allem eingewanderte Monozyten. Neben den migrierten Zellen, scheinen auch Monozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit Rheumatoider Arthritis verändert zu sein. Bisher ist bekannt, dass Monozyten von RA Patienten eine veränderte Kinetik in der Sekretion von sTNF aufweisen. Außerdem wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe eine gesteigerte Expression von membranständigem TNF auf RA Monozyten beschrieben. Die Daten aus bisherigen Studien sind dabei zum Teil widersprüchlich. Ursachen für das veränderte Sekretionsverhalten der Monozyten



sind bisher unaufgeklärt. Die Regulation der TNF Expression ist komplex und findet sowohl transkriptionell als auch posttranslational statt. Eine Schlüsselstellung nimmt dabei die Metalloproteinase ADAM-17 (TACE) ein. Durch proteolytische Spaltung überführt sie das membranständige tmTNF in das lösliche sTNF, auch Ectodomain Shedding genannt. Die TIMP-3 fungiert dabei als physiologischer Inhibitor von ADAM-17 und gilt damit als Mediator in inflammatorischen Prozessen. Dysregulationen in der TNF Prozessierung und Sekretion könnten demnach durch Fehlsteuerungen in der Expression der TACE, respektive deren Aktivität als auch der TIMP-3- Exprimierung begründet sein. Neben TACE besitzt auch die Serinprotease PR-3 die Fähigkeit, membranständiges TNF in lösliches zu überführen. Eine vermehrte Expression wurde bisher u.a. in Monozyten von Patienten mit Vaskulitis gefunden (119).

In der vorliegenden Arbeit wurden Monozyten von RA Patienten auf potentielle intrinsische Dysregulationen im Hinblick auf die TNF Exprimierung und Sekretion untersucht. Dabei wurde die Expression von TNF sowie der an der Prozessierung beteiligten Moleküle ADAM-17, TIMP-3 und PR-3 mit Hilfe von Real Time PCR auf mRNA Ebene als auch mit Durchflusszytometrie auf Proteinebene analysiert. Das Shedding von TNF sowie TNFR2 wurde zusätzlich durch einen ELISA untersucht.

Folgende Aussagen können getroffen werden:

**Unstimulierte Monozyten von RA Patienten unterscheiden sich nicht von gesunden Monozyten im Hinblick auf die mRNA Expression von TNF, ADAM-17, TIMP-3 oder PR-3.**

Unstimulierte Monozyten von RA Patienten zeigten eine Expression von TNF mRNA. Es bestand kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu einer gesunden Kohorte. Die Normalisierung auf das Housekeeping Gen GAPDH ergab eine geringe basale Expression in beiden Gruppen ( $\Delta Ct$ : 0,025 HD vs 0,033 RA,  $p = 0,626$ ). Bisher existieren keine publizierten Daten zur Expression von TACE mRNA in RA Monozyten. Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl Monozyten von RA Patienten als auch Monozyten gesunder Spender ADAM-17 mRNA exprimieren ohne vorherige LPS Stimulation. Die Expressionslevel waren vergleichbar mit der Höhe der TNF mRNA ( $\Delta Ct$ : 0,021 HD vs 0,022 RA,  $p = 0,7731$ ). Die RA Monozyten unterschieden sich nicht in der Expressionsrate. Weiterhin konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass Monozyten von RA Patienten TIMP-3 mRNA exprimieren.

Die Expression im Vergleich zum Housekeeping Gene GAPDH war gering und differierte nicht zur Expression von Monozyten gesunder Spender (0,00027 HD vs 0,000297 RA,  $p = 0,7438$ ). Auch PR-3 mRNA wurde von unstimulierten Monozyten exprimiert. Die Expressionslevel waren vergleichbar mit der TIMP-3 mRNA. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden und den RA Monozyten ( $\Delta C_t$ : 0,00043 HD vs 0,00092 RA,  $p = 0,8665$ ). Auf Ebene der mRNA Expression zeigte sich demnach in keinem der Gene ein Unterschied zwischen den Monozyten gesunder Spender und von RA Patienten. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die Expression auf Ebene der mRNA von RA Monozyten nach Stimulation mit beispielsweise LPS stärker ansteigt, als bei gesunden Monozyten. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig.

### **Die Expression von tmTNF, TACE und PR-3 differiert nicht zwischen gesunden und RA Monozyten.**

RA Monozyten und gesunde exprimieren kaum detektierbares membranständiges TNF auf ihrer Oberfläche. Im Gegensatz zu Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Meusch et. al (94) konnte kein Unterschied hinsichtlich der Expression im Vergleich zu gesunden Monozyten beschrieben werden. ADAM-17 konnte in geringem Ausmaß sowohl auf der Oberfläche von RA Monozyten als auch gesunden nachgewiesen werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Dies entspricht bisherigen Beschreibungen (72). Die Aussagekraft der Quantität membranständiger TACE ist fraglich, da die Aktivität der Metalloproteinase nicht berücksichtigt wird und beispielsweise nach Inhibierung durch TIMP-3, TACE an der Oberfläche von Monozyten akkumuliert, jedoch katalytisch inaktiv ist (131). Die Anzahl der PR-3 positiven Monozyten war bei gesunden (97%) als auch RA Patienten (98%) sehr hoch. Die Expressionslevel der intrazellulären PR-3 unterschied sich nicht zwischen den Gruppen, was den Beobachtungen von Tarzi et. al bei Gesunden und Patienten mit Vaskulitis entspricht (92). Just et. al hingegen konnten in Monozyten von Patienten mit Zystischer Fibrose eine Induktion der intrazellulären PR-3 Expression während pulmonaler Exazerbationen nachweisen (117). Übertragen auf die RA könnte das implizieren, dass aktivierte Monozyten bzw. Makrophagen in betroffenen Gelenken eine gesteigerte PR-3 Expression aufweisen könnten.

### **Monozyten von RA Patienten exprimieren vermehrt intrazelluläres TNF.**

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass unstimulierte Monozyten von RA Patienten signifikant mehr intrazelluläres TNF exprimieren im Vergleich zu Monozyten gesunder

Spender (MFI: 18,44 HD vs. 31,06 RA,  $p = 0,0334$ ). Interessanterweise exprimierten in beiden Gruppen etwa 98 % der Monozyten TNF. Verglichen mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, ist die Anzahl unerwartet hoch (128–130).

### **RA Monozyten exprimieren weniger intrazelluläres TIMP-3.**

In der Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Monozyten von RA Patienten intrazelluläres TIMP-3 exprimieren. Die Expression von TIMP-3 war in den RA Monozyten geringer als bei Monozyten gesunder Spender. Im Mittel exprimierten 23 % der Monozyten gesunder Spender und nur 9 % der RA Monozyten TIMP-3. Auf Grund der hohen interindividuellen Varianz und der kleinen Stichprobe wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ( $p = 0,138$ ). Monozyten von gesunden Spendern, deren CD14+ Zellen TIMP-3 exprimierten zeigten interessanterweise eine deutlich höhere Expression als Monozyten von RA Patienten mit TIMP-3 Expression. Der Unterschied war hochsignifikant (MFI: 5,71 GK vs 3,82 RA,  $p = 0,0098$ ). Dies ist ein Hinweis, dass RA Monozyten einen eher proinflammatorischen Phänotyp ausprägen mit verminderter TIMP-3 Expression und gesteigerter intrazellulärer TNF Akkumulation. So spielt TIMP-3 bei der Differenzierung in proinflammatorische M1 oder antiinflammatorische M2 Makrophagen eine entscheidende Rolle. Eine verminderte TIMP-3 Expression in Makrophagen führt zu einer gesteigerten proinflammatorischen Aktivität und scheint u.a. in der Atherosklerose bedeutsam zu sein (110,132). Eine mögliche Bedeutung TIMP-3 niedrig exprimierender Monozyten in der RA bedarf weiterer Aufklärung.

### **TIMP-3+ RA Monozyten sezernieren nach LPS Stimulation vermehrt TNFR2.**

Monozyten von RA Patienten, deren CD14+ Zellen TIMP-3 exprimieren sezernierten tendenziell mehr sTNFR2 nach Stimulation mit LPS als Monozyten von RA Patienten, ohne TIMP-3 Expression. Auf Grund der kleinen Stichprobe wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (Mean TNFR2 [pg/ml] : 2267 TIMP-3- vs. 3576 TIMP-3+,  $p = 0,0753$ ). Die Beobachtung ist ein weiteres Indiz für einen proinflammatorischen Phänotyp TIMP-3 negativer Monozyten, da sezerniertes sTNFR2 potentiell lösliches TNF binden und somit eine Stimulation von membranständigen TNF Rezeptoren inhibieren kann (134,142). Im Vergleich von RA Monozyten und gesunden zeigte sich ein nichtsignifikanter Hinweis auf eine vermehrte sTNFR2 Sekretion durch RA Monozyten (Mean TNFR2 [pg/ml] 2302 GK vs. 2849 RA,  $p = 0,1715$ ). Dies deckt sich mit den, in anderen Arbeiten beschriebenen, erhöhten sTNFR2 Konzentrationen in Seren und Synovialflüssigkeit von RA Patienten. Interessanterweise sezernierten sowohl unstimulierte als auch stimulierte Monozyten beider Gruppen sTNFR2 im

Gegensatz zu sTNF. Die Sekretion steigerte sich nach Stimulation durch LPS auf das 12- (Monozyten gesunder Spender) respektive 16- (RA Monozyten) fache.

**Monozyten von RA Patienten sezernieren nicht mehr sTNF als gesunde.**

Unstimulierte Monozyten sezernierten kein sTNF. Nach Stimulation durch LPS zeigten sowohl RA Monozyten als auch Monozyten gesunder Spender eine deutliche sTNF Sekretion nach 16 h. Die TNF Konzentration in den Überständen nach Kultur unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht (Mean TNF[pg/ml] 943,9 GK vs 525,5 RA,  $p = 0,288$ ). Bisherige Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hatten unterschiedliche Ergebnisse erbracht. Teilweise konnte eine gesteigerte TNF Sekretion bei Patienten mit früher RA beschrieben werden (61). Andere Studien zeigten keinen Unterschied oder allenfalls einen Differenz in der Kinetik der TNF Sekretion im Vergleich zu Monozyten gesunder Spender (59,101).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Monozyten von RA Patienten eine vermehrte proinflammatorische Aktivität aufweisen. RA Monozyten exprimieren signifikant mehr intrazelluläres TNF. Gleichzeitig ist der Anteil der TIMP-3 positiven Monozyten tendenziell niedriger im Vergleich zu gesunden Spendern. Beim Vergleich der gesunden Spender und RA Patienten, deren Monozyten TIMP-3 exprimieren, zeigte sich eine hochsignifikant gesteigerte TIMP-3 Expression der Monozyten gesunder Kontrollen. Darüber hinaus sezernierten RA Monozyten von Patienten mit TIMP-3 Expression tendenziell mehr sTNFR2 nach LPS Stimulation im Vergleich zu Monozyten von RA Patienten, deren CD14+ Zellen keine TIMP-3 Expression aufwiesen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass TIMP-3 nicht nur bedeutend für die Differenzierung von Makrophagen in einen pro- oder antiinflammatorischen Phänotyp ist, sondern auch eine Rolle in der Regulation der inflammatorischen Aktivität von Monozyten spielt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2010;376(9746):1094–108. doi:10.1016/S0140-6736(10)60826-4.
2. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003(423).
3. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2001;358(9285):903–11. doi:10.1016/S0140-6736(01)06075-5.
4. Hochberg MC, Johnston SS, John AK. The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. *Current medical research and opinion* 2008;24(2):469–80. doi:10.1185/030079908X261177.
5. Young A, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough A, Norton S, et al. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2007;46(2):350–57. doi:10.1093/rheumatology/kel253.
6. Young A, Koduri G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 2007;21(5):907–27. doi:10.1016/j.berh.2007.05.007.
7. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis & Rheumatism* 2000;43(1):30–37.
8. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1987;30(11):1205–13. doi:10.1002/art.1780301102.
9. De Almeida, Denise E, Ling S, Pi X, Hartmann-Scruggs AM, Pumpens P, Holoshitz J. Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2010;185(3):1927–34. doi:10.4049/jimmunol.0904002.
10. Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics* 2004;75(2):330–37. doi:10.1086/422827.
11. Lee YH, Bae S. Association between susceptibility to rheumatoid arthritis and PADI4 polymorphisms: a meta-analysis. *Clinical rheumatology* 2015. doi:10.1007/s10067-015-3098-4.

12. Schellekens GA, Visser, Hendrik, De Jong, Ben A. W., Van Den Hoogen, Frank H. J., Hazes JMW, Breedveld FC, Van Venrooij, Walther J. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis & Rheumatism* 2000;43(1):155–63.
13. Ajeganova S, Humphreys JH, Verheul MK, van Steenberghe, H W, van Nies, J A B, Hafström I, et al. Anticitrullinated protein antibodies and rheumatoid factor are associated with increased mortality but with different causes of death in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study in three European cohorts. *Annals of the rheumatic diseases* 2016. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208579.
14. Symmons DPM, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Silman AJ, Barrett EM, et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis. Results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis & Rheumatism* 1997;40(11):1955–61. doi:10.1002/art.1780401106.
15. Quirke A, Lugli EB, Wegner N, Hamilton BC, Charles P, Chowdhury M, et al. Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2014;73(1):263–69. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202726.
16. Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are t cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis & Rheumatism* 1990;33(6).
17. McInnes Iain B., Schett Georg. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 2011;365(23):2205–19. doi:10.1056/NEJMra1004965.
18. Shingu M., Nagai Y, Isayama T., Naono T., Nobunaga M., Naga Y. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clinical and experimental immunology* 1993;94:145–49.
19. Choy Ernest H.S., Panayi Gabriel S. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 2001;344(12).
20. Lipsky PE, van der Heijde, Desiree M.F.M., St. Clair, E. William, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and Methotrexate in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 2000;343:1594–602.
21. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science (New York, N.Y.)* 1986;234(4775):470–74.

22. Simpson SQ, Casey LC. Role of tumor necrosis factor in sepsis and acute lung injury. *Critical care clinics* 1989;5(1):27–47.
23. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clinical orthopaedics and related research* 1991(262):3–11.
24. Kolb WP, Granger GA. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1968;61(4):1250–55.
25. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975;72(9):3666–70.
26. Old LJ. Tumor necrosis factor. *Scientific American* 1988;258(5):59-60, 69-75.
27. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984;312(5996):724–29.
28. Kelker HC, Oppenheim JD, Stone-Wolff D, Henriksen-DeStefano D, Aggarwal BB, Stevenson HC, et al. Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 1985;36(1):69–73.
29. Saxne T, Palladino, M A Jr, Heinegard D, Talal N, Wollheim FA. Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis and rheumatism* 1988;31(8):1041–45.
30. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The EMBO Journal* 1991;10(13):4025–31.
31. Luettig B, Decker T, Lohmann-Matthes ML. Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *Journal of Immunology* 1989;143:4034–38.
32. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988;53(1):45–53. doi:10.1016/0092-8674(88)90486-2.
33. Shurety W, Merino-Trigo A, Brown D, Hume DA, Stow JL. Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Journal of interferon & cytokine research the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2000;20(4):427–38. doi:10.1089/1079990000312379.

34. Lieu ZZ, Lock JG, Hammond LA, La Gruta NL, Stow JL, Gleeson PA. A trans-Golgi network golgin is required for the regulated secretion of TNF in activated macrophages in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105(9):3351–56. doi:10.1073/pnas.0800137105.
35. Tang P, Hung M-C, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 1996;35(25):8216–25. doi:10.1021/bi952182t.
36. Utsumi T, Takeshige T, Tanaka K, Takami K, Kira Y, Klostergaard J, et al. Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated. *FEBS Letters* 2001;500(1-2):1–6. doi:10.1016/S0014-5793(01)02576-5.
37. Pocsik E, Duda E, Wallach D. Phosphorylation of the 26 kDa TNF precursor in monocytic cells and in transfected HeLa cells. *Journal of inflammation* 1995;45(3):152–60.
38. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine & growth factor reviews* 2004;15(5):353–66. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.011.
39. Rossol M, Meusch U, Pierer, Matthias, Kaltenhäuser, Sylke, Häntzschel H, Hauschildt S, Wagner U. Interaction between Transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells.
40. Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 1990;63(2):251–58. doi:10.1016/0092-8674(90)90158-B.
41. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997;385(6618):729–33. doi:10.1038/385729a0.
42. Domonkos A, Udvardy A, Laszlo L, Nagy T, Duda E. Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *European cytokine network* 2001;12(3):411–19.
43. Bodmer J, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* 2002;27(1):19–26. doi:10.1016/S0968-0004(01)01995-8.
44. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012;119(3):651–65. doi:10.1182/blood-2011-04-325225.
45. Hohmann HP, Remy R, Brockhaus M, van Loon, A P. Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha). *The Journal of biological chemistry* 1989;264(25):14927–34.



46. Schutze S, Machleidt T, Adam D, Schwandner R, Wiegmann K, Kruse ML, et al. Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(15):10203–12.
47. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *European journal of biochemistry / FEBS* 1998;254(3):439–59.
48. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)* 1998;281(5381):1305–08.
49. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995;81(4):495–504.
50. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83(7):1243–52.
51. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* 1998;8(3):297–303.
52. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 1996;87(3):565–76.
53. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer cell* 2004;6(3):203–08. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.003.
54. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995;83(5):793–802. doi:10.1016/0092-8674(95)90192-2.
55. Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: Drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(6):482–93. doi:10.1038/nrd3030.
56. Leeuwenberg JF, Dentener MA, Buurman WA. Lipopolysaccharide LPS-mediated soluble TNF receptor release and TNF receptor expression by monocytes. Role of CD14, LPS binding protein, and bactericidal/permeability-increasing protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1994;152(10):5070–76.
57. Peschon JJ. An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science* 1998;282(5392):1281–84. doi:10.1126/science.282.5392.1281.

58. Krasselt M, Baerwald C, Wagner U, Rossol M. CD56+ monocytes have a dysregulated cytokine response to lipopolysaccharide and accumulate in rheumatoid arthritis and immunosenescence. *Arthritis Research & Therapy* 2013.
59. Liote F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clinical and experimental immunology* 1996;106(1):13–19.
60. al-Janadi N, al-Dalaan A, al-Balla S, Raziuddin S. CD4+ T cell inducible immunoregulatory cytokine response in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 1996;23(5):809–14.
61. Leirisalo-Repo M, Paimela L, Jaattela M, Koskimies S, Repo H. Production of TNF by monocytes of patients with early rheumatoid arthritis is increased. *Scandinavian journal of rheumatology* 1995;24(6):366–71.
62. Rodenburg RJ, van den Hoogen, F H, van de Putte, L B, van Venrooij, W J. Peripheral blood monocytes of rheumatoid arthritis patients do not express elevated TNF alpha, IL-1beta, and IL-8 mRNA levels. A comparison of monocyte isolation procedures. *Journal of immunological methods* 1998;221(1-2):169–75.
63. Stuhlmüller B, Ungethüm U, Scholze S, Martinez L, Backhaus M, Kraetsch HG, et al. Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2000;43(4):775–90. doi:10.1002/1529-0131(200004)43:4<775::AID-ANR8>3.0.CO;2-7.
64. Patel IR, Attur MG, Patel RN, Stuchin SA, Abagyan RA, Abramson SB, et al. TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1998;160(9):4570–79.
65. Ohta S, Harigai M, Tanaka M, Kawaguchi Y, Sugiura T, Takagi K, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) converting enzyme contributes to production of TNF-alpha in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2001;28(8):1756–63.
66. Lisi S, D'Amore M, Sisto M. ADAM17 at the interface between inflammation and autoimmunity. *Immunology letters* 2014;162(1 Pt A):159–69. doi:10.1016/j.imlet.2014.08.008.
67. Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 1997;385(6618):733–36. doi:10.1038/385733a0.

68. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC, Boyer CM, Champion B, Connolly KM, et al. Regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* 1994;370(6490):558–61. doi:10.1038/370558a0.
69. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements JM, Crimmin M, et al. Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF- $\alpha$ . *Journal of leukocyte biology* 1995;57(5):774–77.
70. Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN, Cerretti DP, Alderson M, Kerwar SS, et al. Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* 1994;370(6486):218–20. doi:10.1038/370218a0.
71. Moss ML, Sklair-Tavron L, Nudelman R. Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. *Nature clinical practice. Rheumatology* 2008;4(6):300–09. doi:10.1038/ncprheum0797.
72. Bohgaki T, Amasaki Y, Nishimura N, Bohgaki M, Yamashita Y, Nishio M, et al. Up regulated expression of tumour necrosis factor { $\alpha$ } converting enzyme in peripheral monocytes of patients with early systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases* 2005;64(8):1165–73. doi:10.1136/ard.2004.030338.
73. Qi JH, Anand-Apte B. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) promotes endothelial apoptosis via a caspase-independent mechanism. *Apoptosis an international journal on programmed cell death* 2015;20(4):523–34. doi:10.1007/s10495-014-1076-y.
74. Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight C, Smith BJ, et al. TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Letters* 1998;435(1):39–44. doi:10.1016/S0014-5793(98)01031-X.
75. Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(40):31226–32. doi:10.1074/jbc.M000907200.
76. Ahonen M, Baker AH, Kahari VM. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer research* 1998;58(11):2310–15.
77. Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(16):13787–95. doi:10.1074/jbc.M111507200.
78. Majid MA, Smith VA, Easty DL, Baker AH, Newby AC. Adenovirus mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces death in retinal pigment epithelial cells. *The British journal of ophthalmology* 2002;86(1):97–101.

79. Smith MR, Kung H, Durum SK, Colburn NH, Sun Y. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF- $\alpha$  receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* 1997;9(10):770–80.
80. Mohammed FF, Smookler DS, Taylor, Suzanne E M, Fingleton B, Kassiri Z, Sanchez OH, et al. Abnormal TNF activity in Timp3<sup>-/-</sup> mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nature genetics* 2004;36(9):969–77. doi:10.1038/ng1413.
81. van der Laan, W H, Quax, P H A, Seemayer CA, Huisman, L G M, Pieterman EJ, Grimbergen JM, et al. Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3. *Gene therapy* 2003;10(3):234–42. doi:10.1038/sj.gt.3301871.
82. Cardellini M, Menghini R, Luzi A, Davato F, Cardolini I, D'Alfonso R, et al. Decreased IRS2 and TIMP3 Expression in Monocytes From Offspring of Type 2 Diabetic Patients Is Correlated With Insulin Resistance and Increased Intima-Media Thickness. *Diabetes* 2011;60(12):3265–70. doi:10.2337/db11-0162.
83. Baggiolini M, Bretz U, Dewald B, Feigenson ME. The polymorphonuclear leukocyte. *Agents and actions* 1978;8(1-2):3–10.
84. Rao NV, Wehner NG, Marshall BC, Gray WR, Gray BH, Hoidal JR. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *The Journal of biological chemistry* 1991;266(15):9540–48.
85. Tervaert JW, van der Woude, F J, Fauci AS, Ambrus JL, Velosa J, Keane WF, et al. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Archives of internal medicine* 1989;149(11):2461–65.
86. Henshaw TJ, Malone CC, Gabay JE, Williams, R C Jr. Elevations of neutrophil proteinase 3 in serum of patients with Wegener's granulomatosis and polyarteritis nodosa. *Arthritis and rheumatism* 1994;37(1):104–12.
87. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science (New York, N.Y.)* 1990;249(4975):1431–33.
88. Yard BA, Wille A, Haak M, van der Woude, F J. Human proteinase 3 can inhibits LPS-mediated TNF- $\alpha$  production through CD14 degradation: lack of influence of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Clinical and experimental immunology* 2002;128(3):444–52.
89. Robache-Gallea S, Morand V, Bruneau JM, Schoot B, Tagat E, Realo E, et al. In vitro processing of human tumor necrosis factor- $\alpha$ . *The Journal of biological chemistry* 1995;270(40):23688–92.

90. Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, et al. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(11):6261–66.
91. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis and rheumatism* 2012;64(3):671–77. doi:10.1002/art.33418.
92. Tarzi RM, Liu J, Schneider S, Hill NR, Page TH, Cook HT, et al. CD14 expression is increased on monocytes in patients with anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-associated vasculitis and correlates with the expression of ANCA autoantigens. *Clinical and experimental immunology* 2015;181(1):65–75. doi:10.1111/cei.12625.
93. Baker AH. Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science* 2002;115(19):3719–27. doi:10.1242/jcs.00063.
94. Meusch U, Rossol M, Baerwald C, Hauschildt S, Wagner U. Outside-to-inside signaling through transmembrane tumor necrosis factor reverses pathologic interleukin-1beta production and deficient apoptosis of rheumatoid arthritis monocytes. *Arthritis and rheumatism* 2009;60(9):2612–21. doi:10.1002/art.24778.
95. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in immunology* 2012;33(7):323–32. doi:10.1016/j.it.2012.02.010.
96. Radbruch A. *Flow cytometry and cell sorting*, 2nd ed. Springer lab manual. Berlin, New York: Springer; 2000.
97. Arora SK. Analysis of intracellular cytokines using flowcytometry. *Methods in Cell Science* 2002(24):37–40.
98. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of investigative dermatology* 2013;133(9):e12. doi:10.1038/jid.2013.287.
99. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 2002;30(6):1292–305. doi:10.1093/nar/30.6.1292.
100. Fabris M, Tolusso B, Di Poi E, Tomietto P, Sacco S, Gremese E, et al. Mononuclear cell response to lipopolysaccharide in patients with rheumatoid arthritis: relationship with tristetraprolin expression. *The Journal of rheumatology* 2005;32(6):998–1005.

101. RUSCHEN S, STELLBERG W, WARNATZ H. Kinetics of cytokine secretion by mononuclear cells of the blood from rheumatoid arthritis patients are different from those of healthy controls. *Clinical & Experimental Immunology* 1992;89(1):32–37. doi:10.1111/j.1365-2249.1992.tb06873.x.
102. Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunology series* 1992;56:3–34.
103. Schulze-Koops H, Davis LS, Kavanaugh AF, Lipsky PE. Elevated cytokine messenger RNA levels in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis suggest different degrees of myeloid cell activation. *Arthritis and rheumatism* 1997;40(4):639–47. doi:10.1002/1529-0131(199704)40:4<639::AID-ART7>3.0.CO;2-Y.
104. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1990;144(9):3347–53.
105. Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 1991;34(9):1125–32.
106. Buchan G, Barrett K, Turner M, Chantry D, Maini RN, Feldmann M. Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 alpha. *Clinical and experimental immunology* 1988;73(3):449–55.
107. Husby G, Williams, R C Jr. Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity* 1988;1(4):363–71.
108. Seifert T, Kieseier BC, Ropele S, Strasser-Fuchs S, Quehenberger F, Fazekas F, et al. TACE mRNA expression in peripheral mononuclear cells precedes new lesions on MRI in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 2002;8(6):447–51.
109. Black RA. TIMP3 checks inflammation. *Nature genetics* 2004;36(9):934–35. doi:10.1038/ng0904-934.
110. Gill SE, Gharib SA, Bench EM, Sussman SW, Wang RT, Rims C, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 moderates the proinflammatory status of macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2013;49(5):768–77. doi:10.1165/rcmb.2012-0377OC.
111. Smookler DS, Mohammed FF, Kassiri Z, Duncan GS, Mak TW, Khokha R. Cutting Edge: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 Regulates TNF-Dependent Systemic Inflammation. *The Journal of Immunology* 2006;176(2):721–25. doi:10.4049/jimmunol.176.2.721.

112. Casagrande V, Menghini R, Menini S, Marino A, Marchetti V, Cavalera M, et al. Overexpression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 in Macrophages Reduces Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011;32(1):74–81. doi:10.1161/ATVBAHA.111.238402.
113. Cardellini M, Menghini R, Luzi A, Davato F, Cardolini I, D'Alfonso R, et al. Decreased IRS2 and TIMP3 Expression in Monocytes From Offspring of Type 2 Diabetic Patients Is Correlated With Insulin Resistance and Increased Intima-Media Thickness. *Diabetes* 2011;60(12):3265–70. doi:10.2337/db11-0162.
114. Mahmoodi M, Sahebjam S, Smookler D, Khokha R, Mort JS. Lack of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 results in an enhanced inflammatory response in antigen-induced arthritis. *The American Journal of Pathology* 2005;166(6):1733–40. doi:10.1016/S0002-9440(10)62483-2.
115. Armstrong L, Godinho, S I H, Uppington KM, Whittington HA, Millar AB. Tumour necrosis factor-alpha processing in interstitial lung disease: a potential role for exogenous proteinase-3. *Clinical and experimental immunology* 2009;156(2):336–43. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03906.x.
116. Cowland JB, Borregaard N. Isolation of neutrophil precursors from bone marrow for biochemical and transcriptional analysis. *Journal of immunological methods* 1999;232(1-2):191–200.
117. Just J, Moog-Lutz C, Houzel-Charavel A, Canteloup S, Grimfeld A, Witko-Sarsat V, et al. Proteinase 3 mRNA expression is induced in monocytes but not in neutrophils of patients with cystic fibrosis. *FEBS Letters* 1999;457(3):437–40. doi:10.1016/S0014-5793(99)01098-4.
118. Yang JJ, Pendergraft WF, Alcorta DA, Nachman PH, Hogan SL, Thomas RP, et al. Circumvention of normal constraints on granule protein gene expression in peripheral blood neutrophils and monocytes of patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 2004;15(8):2103–14. doi:10.1097/01.ASN.0000135058.46193.72.
119. Ohlsson S, Hellmark T, Pieters K, Sturfelt G, Wieslander J, Segelmark M. Increased monocyte transcription of the proteinase 3 gene in small vessel vasculitis. *Clinical and experimental immunology* 2005;141(1):174–82. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02819.x.
120. Zhou Z, Richard C, Menard HA. De novo synthesis of proteinase 3 by cytokine primed circulating human polymorphonuclear neutrophils and mononuclear cells. *The Journal of rheumatology* 2000;27(10):2406–11.

121. Robertshaw HJ, Brennan FM. Release of tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) by TNFalpha cleaving enzyme (TACE) in response to septic stimuli in vitro. *British journal of anaesthesia* 2005;94(2):222–28. doi:10.1093/bja/aei021.
122. Doedens JR, Black RA. Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(19):14598–607.
123. Doedens JR, Mahimkar RM, Black RA. TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;308(2):331–38.
124. Zhang Z, Kolls JK, Oliver P, Good D, Schwarzenberger PO, Joshi MS, et al. Activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(21):15839–44. doi:10.1074/jbc.M000604200.
125. Zhang Z, Oliver P, Lancaster, J R Jr, Schwarzenberger PO, Joshi MS, Cork J, et al. Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001;15(2):303–05. doi:10.1096/fj.00-0371fje.
126. Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML, Clay WC, Carter HL, Miller AB, et al. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *The Journal of biological chemistry* 1999;274(43):30563–70.
127. Tellier E, Canault M, Rebsomen L, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G, et al. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Experimental Cell Research* 2006;312(20):3969–80. doi:10.1016/j.yexcr.2006.08.027.
128. Zamora-Atenza C, Diaz-Torne C, Geli C, Diaz-Lopez C, Ortiz MA, Moya P, et al. Adalimumab regulates intracellular TNF $\alpha$  production in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2014;16(4):R153. doi:10.1186/ar4615.
129. Schuerwegh AJ. Influence of therapy with chimeric monoclonal tumour necrosis factor-alpha antibodies on intracellular cytokine profiles of T lymphocytes and monocytes in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 2003;42(4):541–48. doi:10.1093/rheumatology/keg171.
130. Raspe C, Czeslick E, Weimann A, Schinke C, Leimert A, Kellner P, et al. Glutamine and alanine-induced differential expression of intracellular IL-6, IL-8, and TNF-alpha in LPS-stimulated monocytes in human whole-blood. *Cytokine* 2013;62(1):52–57. doi:10.1016/j.cyto.2013.02.020.



131. Brennan FM, Green P, Amjadi P, Robertshaw HJ, Alvarez-Iglesias M, Takata M. Interleukin-10 regulates TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM-17) involving a TIMP-3 dependent and independent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 2008;38(4):1106–17. doi:10.1002/eji.200737821.
132. Johnson JL, Sala-Newby GB, Ismail Y, Aguilera CM, Newby AC. Low tissue inhibitor of metalloproteinases 3 and high matrix metalloproteinase 14 levels defines a subpopulation of highly invasive foam-cell macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008;28(9):1647–53. doi:10.1161/ATVBAHA.108.170548.
133. Matsumoto T, Kaneko T, Seto M, Wada H, Kobayashi T, Nakatani K, et al. The membrane proteinase 3 expression on neutrophils was downregulated after treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2008;14(2):186–92. doi:10.1177/1076029607303961.
134. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *The Journal of experimental medicine* 1992;175(2):323–29.
135. Aderka D, Wysenbeek A, Engelmann H, Cope AP, Brennan F, Molad Y, et al. Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 1993;36(8):1111–20.
136. Aderka D, Englemann H, Hornik V, Skornick Y, Levo Y, Wallach D, et al. Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer research* 1991;51(20):5602–07.
137. Lopatnikova JA, Golikova EA, Shkaruba NS, Sizikov AE, Sennikov SV. Analysis of the levels of tumour necrosis factor (TNF), autoantibodies to TNF, and soluble TNF receptors in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* 2013;42(6):429–32. doi:10.3109/03009742.2013.794471.
138. Cope AP, Aderka D, Doherty M, Engelmann H, Gibbons D, Jones AC, et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis and rheumatism* 1992;35(10):1160–69.
139. Barrera P, Boerbooms AM, Janssen EM, Sauerwein RW, Gallati H, Mulder J, et al. Circulating soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-2 receptors, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 levels in rheumatoid arthritis. Longitudinal evaluation during methotrexate and azathioprine therapy. *Arthritis and rheumatism* 1993;36(8):1070–79.

140. Glossop JR, Dawes PT, Matthey DL. Association between cigarette smoking and release of tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2006;45(10):1223–29. doi:10.1093/rheumatology/kei094.
141. Joyce DA, Kloda A, Steer JH. Dexamethasone suppresses release of soluble TNF receptors by human monocytes concurrently with TNF-alpha suppression. *Immunology and cell biology* 1997;75(4):345–50. doi:10.1038/icb.1997.53.
142. Engelman H, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, Wallach D. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *The Journal of biological chemistry* 1989;264(20):11974–80.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozessierung von tmTNF. ....	8
Abbildung 2: Expression von transmembranem TNF (tmTNF) auf Monozyten von RA Patienten und gesunden Spendern. ....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Abbildung 3: Expressionslevel von TNF $\alpha$ , PR-3, TIMP-3 und ADAM-17 mRNA in Monozyten gesunder Spender und RA Patienten .....	22
Abbildung 4: TACE Expression [relative Anzahl in %] auf Monozyten gesunder Spender und RA Patienten.....	24
Abbildung 5: TACE Expression [MFI] auf Monozyten gesunder Spender und RA Patienten.....	24
Abbildung 6: Intrazelluläre TNF $\alpha$ Expression .....	25
Abbildung 7: intrazelluläre Expression von TNF $\alpha$ in Monozyten von RA Patienten und gesunden Spendern .....	25
Abbildung 8: Intrazelluläre Expression von PR-3 in Monozyten gesunder Spender und RA Patienten.....	26
Abbildung 9: Intrazelluläre Expression von TIMP-3 in Monozyten gesunder Spender und RA Patienten.....	27
Abbildung 10: Quantitative intrazelluläre Expression von TIMP-3 in TIMP-3+ Monozyten gesunder Spender und RA Patienten.....	28
Abbildung 11: TNFR2 Shedding von Monozyten gesunder Spender (HD) und RA Patienten .....	29
Abbildung 12: TNF $\alpha$ Sekretion von Monozyten gesunder Spender und RA Patienten.....	30

Abbildung 13a,b: Vergleich der sTNFR2 Shedding von TIMP-3+ Monozyten von RA Patienten.....	31
--	----

## **8. Eigenständigkeitserklärung**

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Informationen

- Familienstand: Ledig
- Nationalität: Deutsch
- Geburtsdatum: 19.10.1982
- Geburtsort: Wittlich
- Eltern: Ursula Mathar , geb. Dockter (Hauptschullehrerin)  
Ernst Mathar (Bankkaufmann)

### Bildungsweg:

- März 2002: Abitur am St. - Matthias - Gymnasium Gerolstein mit einer Auszeichnung im Fachbereich Physik (für sehr gute Leistungen)
- April. 2002  
- Dezember. 2002: Wehrdienst Heinrich-Hertz-Kaserne Daun
- April. 2003  
– September. 2008: Studium Sport und Physik auf Lehramt an Realschulen an der Universität Koblenz-Landau
- August.  
-November. 2008: Examensarbeit über die Anpassungserscheinungen des Herzmuskels im Kraftsport mit der Note sehr gut (1,0) (Auszeichnung der Universität Koblenz-Landau)
- September 2008: 1. Staatsexamen für das Lehramt an Realschulen (Physik, Sport) mit der Note gut (1,6)
- Sep. 2008  
– März 2009: wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Medizintechnik und Informationsverarbeitung Mittelrhein (MTI)
- April 2009  
- September 2011: Studium der Medizin an der Georg-August-Universität Göttingen
- März 2011: Ablegen des Physikums mit der Note gut
- Oktober 2011  
- März 2016 : Studium der Medizin an der Universität Leipzig
- Oktober 2014: Ablegen des Zweiten Staatsexamens mit der Note Sehr Gut
- November 2015: Ablegen der Ärztlichen Prüfung mit der Note Sehr Gut
- Seit April 2016: Assistenzarzt für Innere Medizin am Spital Zweisimmen

## **10. Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Ulf Wagner und Frau Dr. Manuela Rossol für die Vergabe des Promotionsthemas, das entgegengebrachte Vertrauen und die Ermöglichung der Durchführung von experimentellen Arbeiten im Forschungslabor des Instituts für Experimentelle Rheumatologie. Auch bin ich ihnen für Ihre Motivation, die Anleitung beim wissenschaftlichen Arbeiten und die offenen Ohren bei Auftauchen von Fragen während allen Phasen der Forschungsarbeit dankbar.

Mein herzlichster Dank gilt auch den anderen wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors, die mir stets mit Rat und Tat und ihrer Erfahrung zur Seite standen. Insbesondere möchte ich mich bei Katrin Otto, Kathrin Rothe, Nora Raulien, Kristin Schubert und Cornelia Arnold bedanken, die mich mit Hilfsbereitschaft und Humor durch den Laboralltag begleitet haben. Ohne ihre Aufmunterungen, Erklärungen und experimentelles Geschick wäre diese Arbeit nicht fertig gestellt worden.

Schließlich möchte ich mich noch besonders bei Frau Dr. Dorit Schleinitz bedanken, die mir bei der Planung und Auswertung der qPCR sehr geholfen hat.